

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÉZISEK

**ÚJ EREDMÉNYEK A NEUROMUSCULARIS BETEGSÉGEK MOLEKULÁRIS
DIAGNOSZTIKÁJA ÉS TERÁPIÁJA TERÜLETÉN**

DR. MOLNÁR MÁRIA JUDIT

2010

BUDAPEST

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés és célkitűzések

2. Előzmények és irodalmi összefoglalás

- 2.1. A mitochondriális betegségek molekuláris jellemzése és diagnosztikája
- 2.2. Az izomdystrophiák molekuláris alapjai, diagnosztikája és terápiás lehetőségei
- 2.3. A hereditár neuropathiák jellegzetességei és state of the art genetikai diagnosztikája

3. Beteganyag és módszerek

- 3.1. Vizsgált betegek
- 3.2. Alkalmazott módszerek
 - 3.2.1. PET és Doppler vizsgálatok
 - 3.2.2. Morfológiai vizsgálatok: fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok
 - 3.2.3. Molekuláris biológiai metodikák
 - 3.2.4. Génterápiás vizsgálatok

4. Eredmények

- 4.1. Mitochondriális betegségek
 - 4.1.1. Új mtDNS rendellenességek, új mtDNS betegségek leírása
 - 4.1.2. Az A8344G szubsztitúció fenotípus variációi
 - 4.1.3. Az mtDNS *tRNS^{Lys}* mutációk jelentőségének elemzése mitochondriális betegségekben
 - 4.1.4. Az *RRM2B* gén heterozygóta mutációjának új klinikai megjelenése: autosomális domináns progresszív ophthalmoplegia externa
 - 4.1.5. A cerebrális vérátáramlás és glükóz metabolizmus mitochondriális betegségben
 - 4.1.6. Új diagnosztikai módszer validálása az mtDNS betegségek prenatális felismerésére
 - 4.1.7. Az mtDNS A3243G és A8344G mutációk epidemiológiai elemzése Magyarországon
- 4.2. Izomdystrophiák
 - 4.2.1. Dystrophin deficienciához társuló szekunder calpain deficiencia
 - 4.2.2. Sükettség, mint a dystrophin deficiencia allélikus variánsa
 - 4.2.3. Kihívások a dysferlinopathiák diagnosztikájában
 - 4.2.4. A glycosylations rendellenességek szerepe a végtagöv típusú izomdystrophiákban
 - 4.2.5. A dystrophinopathiák molekuláris terápiája
- 4.3. Hereditár perifériás neuropathiák
 - 4.3.1. Új mutációk leírása örökletes neuropathiákban
 - 4.3.2. Roma neuropathiák diagnosztikája Magyarországon
 - 4.3.3. Mitofusin mutáció következtében kialakuló ultrastrukturális elváltozások
 - 4.3.4. Primer és szekunder mitochondriális diszfunkcióhoz társuló neuropathia
 - 4.3.5. Hereditár neuropathia (*PMP22* duplikáció) és autoimmun betegségek együttes előfordulása

5. Megbeszélés

- 5.1. A neurológiai és pszichiátriai tünetek és a genotípus összefüggéseinek elemzése mitochondriális betegségekben
- 5.2. A mitochondriális *tRNS^{Lys}* gén és határoló régióiban talált eltérések jelentősége
- 5.3. Az mtDNS A3243G és A8344G mutációinak genetikai epidemiológiai vizsgálata
- 5.4. A molekuláris biológiai vizsgálatok szerepe az mtDNS betegségek diagnosztikájában és prenatális diagnosztikájában
- 5.5. A nukleáris *RRM2B* gén heterozygóta mutációja, mint az autosomális domináns progresszív ophthalmoplegia externa új etiológiája
- 5.6. Izomdystrophiák és hereditár neuropathiák molekuláris diagnosztikai stratégiája
 - 5.6.1. A szekunder calpain deficiencia jelentősége az izomdystrophiák diagnosztikája során

- 5.6.2. A nem kódoló DNS jelentősége az izomdystrophiák patogenezisében
- 5.6.3. A glycosylatio szerepe a végtagöv típusú izomdystrophiákban
- 5.6. 4. A hereditér neuropathiák diagnosztikai stratégiája
- 5.7. Az izombetegségek molekuláris terápiáinak realitásai és útvesztői

6. Az elért tudományos eredmények

7. A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

8. Köszönetnyilvánítás

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos munkásságom az elmúlt 2 évtizedben a neuromusculáris és neurogenetikai betegségek kutatására irányult. Az alkalmazott módszerek a neurológiai és pszichiátriai diagnosztikus vizsgálatok mellett képző eljárásokat, morfológiai és molekuláris genetikai vizsgálatokat foglaltak magukba. Az értekezés fő témakörei a mitochondriális medicina, az izomdystrophiák és a hereditær neuropathiák molekuláris diagnosztikája és terápiája köré csoportosulnak. Kutatási projektek nem csak a szorosabb értelemben vett klinikai kutatásokra irányultak, hanem a hazai kutatási infrastruktúra stratégiai fontosságú alappilléreket képező biobankok építését is jelentették (NEPSYBANK). A tézisek alapjául szolgáló közlemények csak egy részét teszik ki a megjelent publikációimnak, csak szorosan a feldolgozott témához kapcsolódó tudományos eredmények kerültek megemlítsékre.

Célkitűzéseim: a neuromusculáris betegségek (mitochondriális betegségek, izomdystrophiák, örökletes perifériás neuropathiák) háttérben álló genomikai rendellenességek megismerése, a genomikai eltérések hatásának elemzése a fenotípusa, a központi idegrendszerre (KIR), a vázizomra és perifériás idegekre. Duchenne típusú izomdystrophiában a plazmid mediálta géntranszfer optimalizálása és humán alkalmazásra való előkészítése.

2. ELŐZMÉNYEK, IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS

2.1. A mitochondriális betegségek molekuláris jellemzése és diagnosztikája

A mitochondriális cytopathiák a multiszisztémás betegségek heterogén csoportját alkotják, amelyek döntően a központi idegrendszer és a vázizom betegségeit eredményezik, de számos egyéb szerv működészavarát is okozhatják. Elsősorban a nagy energiaigényű szövetek, mint a központi idegrendszer, vázizmok, szívizom, az endokrin szervek, máj, vese és a szem érintettek. A klinikai tünetek specifikusak, de nagyon változatosak. A mitochondriális betegség kialakulásához a mitochondriumok működését meghatározó materiálisan öröklődő mitochondriális DNS (mtDNS), és nukleáris DNS (nDNS) mutációi vezethetnek. A DNS mutációja okozhat nukleonid-szubsztitúciót, ami érinthet tRNS-t, rRNS-t vagy stuktúrgént és eredményezhet delécióval/duplikációval járó génátrendeződést. Esetenként az mtDNS depléción okoz súlyos tüneteket. A mitochondriális betegségek (mtDNS és nDNS kapcsolt) átlag prevalenciája mai ismereteink alapján 1: 5000-re becsülhető. Egyes mitochondriális DNS mutációk kifejezetten gyakoriak, ezek közül kimagaslik az A3243G pontmutáció, amelynek előfordulási gyakorisága felnőtt finn populációban eléri a 16,3/100.000-t. Eddig közel 200 betegség háttérben azonosítottak kb. 500 patogén mtDNS mutációt (www.mitomap.org). A nDNS kutatások tempójának felgyorsulása következtében egyre több nukleáris mitochondriális gén mutációja is összefüggésbe hozható valamely klinikai fenotípussal. A mitochondriális betegségek alosztályokba sorolása számos problémát vet föl a mitochondriális biológia sajátosságainak köszönhetően. Ezek a sajátosságok: az egyes szövetek, sejtek eltérő mitochondrium tartalma, a vad és mutáns mtDNS-ek együttes jelenléte a sejtekben (heteroplasmia); a threshold effektus (a sejtek diszfunkciójához bizonyos heteroplasmia arány elérése szükséges), ugyanazon mtDNS mutáció változatos klinikai képet eredményezhet, nincs egyértelmű fenotípus-genotípus korreláció. Mindezek alapján a klinikai diagnosztika számára a tisztán klinikai alapon történő klasszifikáció a leghasznosabb annak ellenére, hogy sok beteg nem sorolható egyik kategóriába sem. Sok esetben a béta-oxidációs zavarok jelentik a nehézséget, de ezekben a myopathológiai diagnosztika segítséget jelenthet a klinikus számára (3. és 10. Közlemény).

A mitochondriális betegségek háttérben álló gének és azok mutációi

Az emberi mtDNS cirkuláris, kettősszalú molekula, mely maternálisan öröklődik, 16569 bp-ból áll, 37 ismert gént tartalmaz. A guanin-gazdag nehéz lánc (L) 2 tRNS-t, az I. komplex 6 alegységét, a III. komplex cytochrom b-jét, a IV. komplex legnagyobb alegységeit (*COI., II., III.*) és az V. komplex ATP alegységeit kódolja. A cytosin-gazdag könnyű lánc (H) a 8 tRNS és az I. komplex 1 alegységének kódolásáért felelős. A mitochondriális genom által kódolt polypeptidek az oxidatív foszforilációs rendszer tagjai. A légzési lánc és az oxidatív foszforiláció többi polypeptidjét a nukleáris DNS kódolja és azok döntően a cytosolban szintetizálódnak. A „displacement regio” (D-loop) rövid nem-kódoló szakaszának kivételével nincsenek nem kódoló génszakaszok (intronok) a H láncon. A

humán mitochondriális transzkripció két origóból indul és a prokaryota szervezetekhez hasonlóan polycisztronikus. Az mtDNS nem rendelkezik protektív hatású hisztonokkal, repair rendszere fejletlen, így a mutagén ágensekkel szemben rendkívül érzékeny, mutációs rátája kb.10-szerese a nukleáris DNS-ének. A sejtek osztódásakor a mutáns mitochondriális DNS molekulák aránya a mitotikus szegregációnak köszönhetően az egyes leány sejtekben eltérő lehet. A mitochondriális genom mutációi lehetnek germ-line és szomatikus mutációk. A germ-line mutációk mindig átörökítődnek, ezek képezik az alapját az egyes etnikai csoportok közötti polymorphizmusnak és a primer mitochondriális betegségeknek. A szomatikus mutációk az élet során keletkeznek és az életkor előrehaladtával számuk a posztmitotikus szövetekben felhalmozódik. Az mtDNS germ-line mutációi lehetnek egyes nagy deléciók és egyes (single) nukleotid polymorphizmusok (SNP-k). A deléciók általában sporadikusak, de beszámoltak maternálisan öröklődő formákról is. A deléciók mérete 1.3 és 11 kb között ingadozik, lokalizációjuk változó lehet. Leggyakrabban a 4.9 kb nagyságú ún. „common deletion” írták le, mely az I-IV. komplexet és a közbeeső tRNS-eket kódoló génszakaszt érinti. A mitochondriális genom egyes delécióinak leggyakoribb előfordulását Kearns-Sayre szindrómában, progresszív ophthalmoplegia externában (PEO) és Pearson szindrómában írták le. Vannak multiplex mtDNS deléciók is, melyek általában másodlagosak, a nukleáris DNS károsodása következtében alakulnak ki. Az mtDNS pontmutációi gyakran a tRNS génekben alakulnak ki. Ez utóbbi következtében több protein működése is károsodhat. Egy mitochondriális pontmutáció sokféle neurológiai tünetcsoportot eredményezhet, melyek némelyike jól körülhatárolt szindrómaként ismert.

Az mtDNS károsodása következtében kialakuló kórképek

Az mtDNS tRNS-asszociált betegségei

A tRNS gének csupán az mtDNS 1/10-ét teszik ki, az ismert pontmutációk 42%-a mégis erre a régióra lokalizálódik (www.mitomap.org). A tRNS gének így mutációs hot spotnak tekinthetők. Gyakori tRNS-asszociált betegségek: myopathia, encephalomyopathia, cardiomyopathia, sükettség, ophthalmoplegia externa, ataxia, myoclonus, demencia, depresszió, diabetes mellitus+sükettség, terhelési intolerancia, myoglobinuria, Leigh szindróma, MELAS, MERRF, perifériás neuropathia, Parkinson-kór, vashiányos anaemia és diabetes mellitus. A mt tRNS mutációk többek között az aminoacyláció zavara következtében eredményezik a mitochondriumban a hibás fehérjeszintézist. Ha a mutáció evolúciósan konzervált nukleotidot érint, általában súlyosabb következményekkel jár a bázispár csere. A mutáció fenotípusos megjelenését a mutáns tRNS-ek heteroplasmia-aránya is befolyásolja. Ha a tRNS-ek funkcionális szintje a normális 15-50%-ára csökken kóros fenotípust kapunk. A tRNS mutációk leggyakrabban a *tRNS^{Leu}*, *tRNS^{Lys}*, *tRNS^{Ile}* és a *tRNS^{Ser}* géneket érintik. A *tRNS^{Leu}* gén több mint 30 patogén mutációjával a legismertebb mutációs hot spotja a mtDNS-nek (www.mitomap.org). Ezek közül a patogén mutációk közül a leggyakoribb a *tRNS^{Leu}* gén A3243G mutációja, amely többek között a jól ismert MELAS szindrómát (mitochondriális encephalomyopathia laktát acidózis stroke szerű tünetekkel) okozza. Ez a mutáció számos más klinikai tünetet is eredményezhet, mint pl. alacsony növés, sensoneurális hallásvesztés, hypertrophiás cardiomyopathia, ataxia, ophthalmoplegia externa, epilepsia és diabetes mellitus. A mutáció prevalenciáját több országban vizsgálták. A legtöbb vizsgálat diabetes mellitus-os betegekben történt. Sensoneurális hallásvesztés, fiatalkori ischaemiás stroke szindróma, myopathia és ataxia háttérében a mutáció előfordulási gyakoriságát eddig hat tanulmány vizsgálta, amelyekben a mutáció frekvenciája 0,07% és 6,5% között volt. A legnagyobb prevalenciát a finn népesség körében találták (16,3:100.000). A *tRNS^{Lys}* génben eddig 14 patogén mutációt azonosítottak. Ezek közül legfrekvenciáltabban az A8344G szubsztitúciót írták le, amelyet először a MERRF (Myoclonus Epilepsia Ragged Red Rostokkal) szindróma háttérében azonosítottak. Az elmúlt 20 évben számos más fenotípussal való társulásáról is olvashattunk.

Az mtDNS rRNS-asszociált betegségei

Az mt genomban két gén kódolja a riboszómális RNS-eket (*RNR1* - 12S rRNS és *RNR2* - 16S rRNS). A 12S rRNS-t kódoló génben az irodalomból 13 patogén mutáció ismert, amelyek legnagyobb számban aminoglycosidas indukálta süketséget eredményeznek, de 1-2 szubsztitúciót sensorineurális hallásvesztés háttérében is leírtak. A 16S rRNS-t kódoló mt – *RNR2* génben talált 4 különböző nukleotid csere eltérő fenotípusokat eredményez, mint cardiomyopathia, diabetes mellitus, hyperthyreosis, Rett szindróma, MELAS, Alzheimer és Parkinson kór.

Az mtDNS protein kódoló génekhez kapcsolt betegségei

A mitochondriális légzési transzportlánc felépítésében kb. 80 fehérje vesz részt. Ezek közül a mitochondriális genomban csak 13 kódoló gén található, melyek a légzési transzportlánc egyes alegységeit kódolják. Az mtDNS protein-kódoló génjeiben több mint 200 patogén mutáció ismert (www.mitomap.org). A legtöbb mutáció a NADH dehidrogenáz és a cytochrom-c oxidáz különböző alegységeit kódoló génekben található. Emellett kisebb számban találhatók mutációk a cytochrom oxidáz-b és az ATP-áz 6-os, 8-as alegységeit kódoló génekben is. A protein-kódoló gének mutációi leggyakrabban a Leber-féle optikus neuropathia (LHON), Leigh szindróma, prosztata rák, terhelési intolerancia, NARP, MELAS szindróma hátterében állhatnak. Néhány nukleotid szubsztitúciót motoneuron betegség, ataxia, Kearns-Sayre szindróma, vashiányos anaemia hátterében is leírtak.

A nukleáris DNS mitochondriális génjei és azok mutációi következtében kialakuló betegségek A mitochondriális funkciót a sejtmag és a mitochondrium DNS molekuláinak koordinált működése határozza meg. A mitochondrium működését befolyásoló nukleáris gének lehetnek légzési transzportlánc alegységeit kódoló, az intergenomiális szignalizációban szerepet játszó, a mitochondriális dinamikát befolyásoló, a lipid milieu-ért felelős, és egyéb a mitochondrium működését befolyásoló fehérjéket kódoló gének. A mitochondriális transzlációs gépezet több nukleárisan determinált polypeptidet és mitochondriálisan kódolt rRNS-t, tRNS-t is tartalmaz, illetve a nagy respiratorikus komplexek mindkét genom által kódolt alegységekből állnak. A nDNS kb. 1000 mitochondriális proteint kódol, melyek közül mindössze 67 játszik szerepet a légzési lánc működésében. Az nDNS által kódolt mitochondriális proteinek a cytoplasmában szintetizálódnak és specifikus transzport rendszer segítségével importálódnak a mitochondriumba. A mitochondriumok azon kívül, hogy a sejtek energia metabolismusában alapvető szerepet játszanak számos egyéb cellularis folyamatban is résztvesznek. Biogenezisükben, ill. működésükben a nukleáris és mt genom közötti párbeszéd alapvető fontosságú. Az intergenomikus szignál károsodása a mtDNS-t mind mennyiségileg (mtDNS depléción), mind minőségileg érintheti (többszörös mtDNS deléciók szindrómák). Multiplex deléciókat tartalmazó mtDNS molekulák nagyon kis mennyiségben az egészséges felnőtt szövetekben is megfigyelhetők. Normális feltételek mellett az átrendeződött és vad típusú mtDNS-ek aránya egyensúlyban van, az átrendeződés folyamatosan elvész és újonnan kialakul, de soha nem emelkedik a fiziológiásan még tolerálható küszöb fölé.

A mitochondriális betegségek molekuláris genetikai diagnosztikai lehetőségei

Néhány esetben már a klinikai kép is jellegzetes az illető mitochondriális betegségre (MELAS, MERRF, LHON, SCO2, stb.) és a diagnózishoz elegendő a vérből izolált DNS molekuláris genetikai tesztje. A legtöbb esetben azonban nem ilyen könnyű a helyzet és több diagnosztikus procedurát is be kell iktatni a genetikai vizsgálat elé, mint pl. ENG vizsgálat, (14. Közlemény) multimodális elektrofiziológiai vizsgálatok (7. Absztrakt) vér/liquor laktát szint vizsgálat, képalkotó eljárások, cardiológiai vizsgálat, az izombiopszia hisztológiai, hisztokémiai és biokémiai feldolgozása és a DNS analízis (8. Absztrakt). A molekuláris genetikai tesztek az mtDNS Southern blotját, a real time PCR-rel történő kvantitatív mtDNS mennyiség meghatározást, SNP screeninget, a teljes mitochondriális genom vagy a gyanús nukleáris gén szekvenálását foglalják magukban.

Genetikai tanácsadás, prenatalis diagnosztika a mitochondriális betegségekben

Az mtDNS betegségekben az mtDNS jellegzetességei miatt a genetikai tanácsadás lehetetlen. A nő ivarsejtek embryogenezise során az mtDNS transzmisszióját az „üvegnyak-hatás” következtében kialakuló random genetikai draft determinálja, így nem tudhatjuk, hogy az mtDNS betegségben szenvedő betegek egyes oocytaiban mennyi a vad és mutans mtDNS molekulák aránya. Így a következő generációban a betegség ismétlődésének valószínűsége nem becsülhető. Prenatalis diagnosztikára a terhesség 12. hete után van lehetőség. Ilyen esetekben a 20-30%-nál magasabb heteroplasmia arányú foetusok esetén a terhesség terminációja javasolt. Figyelembe véve, hogy az mtDNS betegségben szenvedő anyák sok esetben nehezen vagy spontán nem esnek teherbe, mivel a betegség endokrin rendszerüket is érintheti további új megoldások iránti igény vetődött föl. Számukra új lehetőségként kínálkozik a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD), melynek validálására irányultak vizsgálataink. Sok esetben etikai, vallási megfontolások vezetik ez utóbbi diagnosztika felé

a betegeket. A PGD során farmakológiai ovuláció stimulációt követően in vitro történik a megtermékenyítés. A korai stádiumú embriók (általában 8 sejtes blastomer stádium) 1-1 blastomer sejtjét választják le. A blastomer sejtek PCR alapú genetikai diagnosztikája nyújt információt az embrió genotípusáról. Így az implantációra kerülő egészséges embriók szelektálhatók.

2.2. Az izomdystrophiák molekuláris alapjai, diagnosztikája és terápiás lehetőségei

Az izomdystrophiák klasszikus osztályozása, mely szerint megkülönböztetünk Duchenne/Becker, Emery-Dreifuss, végtag öv típusú, facioscapulohumeralis és congenitalis izomdystrophiát ma egyre inkább átalakul a molekuláris neurológia bővülő ismeretanyagának köszönhetően. A Duchenne/Becker típusú izomdystrophia elnevezést a dystrophinopathia cserélte föl, a végtag öv típusú és congenitalis izomdystrophiák csoportjaiban is a genetikai defektus alapján azonosítjuk a kórképet. Az izombetegségeket a molekuláris patomechanizmus alapján az alábbiak szerint klasszifikálhatjuk.

1. Sarcolemma és extracellularis matrix rendellenességek
2. Myonukleáris rendellenességek
3. Lysosomális rendellenességek
4. Myofibrillaris és cytoskeletalis deformitások
5. Ioncsatorna betegségek
6. Developmentalis betegségek
7. Az energia metabolizmus zavarai

A sarcolemma és extracellularis matrix protein rendellenességek klinikailag a Duchenne/Becker típusú izomdystrophia (DMD/BMD) és a végtag öv típusú izomdystrophia (LGMD) formájában jelentkeznek. A Duchenne/Becker típusú fiatal korban kezdődő, gyors progressziójú, korán tragikusan végződő izomdystrophiát az X kromoszómán elhelyezkedő dystrophin gén deléciója ill. pontmutációja okozza, azáltal, hogy dystrophin deficienciát, vagy trunkált proteint eredményez. A DMD klinikai megjelenése, kórlefolyása, súlyossága sztereotipizált, annak ellenére, hogy a motorika, a légzésfunkció és a cardialis érintettség interindividuális különbségeit már a dystrophin gén felismerése előtt is jól ismerték. Kevés közlemény vizsgálta az identikus mutációk következtében kialakuló fenotípus variabilitást. Egyesek a központi idegrendszer érintettségéről, sőt a retina károsodásáról, is beszámolnak. Elvértve olvashatunk olyan feltételezésről, amely az X kromoszómához kötötten öröklődő halláskárosodás hátterében is a dystrophin gén hibáját véli. A dystrophin deficienciában az intracelluláris Ca^{2+} tartalmat csökkentenek találtuk, amelyet jól magyarázhat a dystrophin hiány következtében kialakuló sejtmembrán károsodás (2. Közlemény). Napjainkban a súlyos betegség kezelésében ígéretes új farmakológiai, gén és sejtherápiás technikák sorakoznak, ezért elengedhetetlenné vált a betegség természetes lefolyásának mélyebb megismerése. X kromoszómához kötötten öröklődő izomdystrophiák még az Emery-Dreifuss szindróma, a Danon betegség (LAMP2 deficiencia) és az excessive autophagiával járó izomdystrophia (VMA21 deficiencia). Az Emery-Dreifuss szindrómát okozó emerin deficiencia a myonukleáris rendellenességek közé tartozik, míg az utóbbi 2 betegség a lysosomális rendellenességek közé sorolható.

Az végtagöv típusú izomdystrophia (LGMD) a progresszív izombetegségek genetikailag heterogén csoportja, melynek autoszomális domináns (LGMD1) és autoszomális recesszív (AR) formái (LGMD2) ismertek. A dominánsan öröklődő forma hátterében eddig három gén (myotilin, lamin A/C, caveolin-3, és négy lókuszt (6q 23, 7q35, 7q31.1-31, 4p21) hibáját igazolták. A recesszív formánál eddig 11 gén szerepét írták le. A recesszíven öröklődő gének determinálhatnak sarcolemmához kapcsolódó fehérjéket, mint a 4 féle sarcoglycant; extracellularis matrix proteineket, mint a merosint; egyéb plasma membrán proteineket, mint a caveolin-3-t, dysferlint; sarcomerikus proteineket, mint a telethonint és titint. Az alpha dystroglycan (α -DG) glycosylatiojában szerepet játszó enzimek, mint a TRIM32, POMT1, POMT2, fukutin related protein (FKRP) rendellenessége is okozhat izomdystrophiát. Az α -DG hypoglycosylatioját figyelték meg különböző congenitalis izomdystrophiában (MDC), mint a „Muscle-Eye-Brain” betegségben, a Fukuyama izomdystrophiában, MDC1C-ben (fukutin related protein deficiencia), MDC1D (Large deficiencia) és Walker-Warburg szindrómában. Nemrég az α -DG csökkent glycosylatioját figyelték meg néhány LGMD esetben is. A csökkent α -DG glycosylatiót mutató LGMD2I az MDC1C allelikus variánsa. Az LGMD ebben a típusában is a fukutin related protein (FKRP), egy glycosyltranszferáz mutációja igazolódott. LGMD2I relative gyakorinak tűnik az európai eredetű LGMD betegek között. Egy nagy észak-amerikai LGMD-kohortban az izombiopszák 15 %-ban találtak csökkent hyperglycosylatalt α -DG

expressziót. Ezek 37 %-a rendelkezett a gyakori *FKRP* mutációval. Ezek alapján a dystroglycanopathiák döntő többségében a háttérben álló molekuláris defektus még azonosíthatatlan. A fent említett proteinek deficienciájának rutin diagnosztikus igazolása immunhisztokémiai és genetikai tesztekkel ma már egyre több helyen elérhető. A jó diagnosztikus lehetőségek ellenére azonban számos LGMD etiológiája felderítetlen marad. Saját tapasztalataink szerint is az LGMD betegek kb. 40%-nál a részletes átvizsgálás ellenére sem születik meg a specifikus molekuláris diagnózis. Ez a tény további új metodikák klinikai diagnosztikába való bevezetését teszi szükségessé.

A jelen bevezetőben a fenti proteinek közül az α -DG mellett a calpain és dysferlint tárgyaljuk részletesen mivel vizsgálataink során ezek bírnak kiemelt jelentőséggel. Az LGMD 2A, a calpain 3 genetikai hibája következtében alakul ki, AR módon öröklődik, a medenceöv, a scapula és a törzsizmok atrophijával, gyengeségével kezdődik. Fokozatos progresszió következtében a betegség kezdete után 10-20 évvel a beteg gyakran toloszékbe kényszerül. A calpain deficiencia lehet elsődleges vagy másodlagos. Ez utóbbit eddig leggyakrabban a dysferlin deficienciával együtt írták le, de 2q-kapcsolt izom dystrophiában és facioscapulohumeralis izomdystrophiában (FSHD) is találtak szekunder calpain deficienciát. A másodlagos calpain hiány kialakulásának patomechanizmusa nem ismert. Indukált calpain deficiencia időnként akár terápiás hatású is lehet. Waheed et al (Hum Gene Ther 2005;16:489-501) azt tapasztalták, hogy a proinflammatorikus citokinek gátolják a proteolitikus aktivitását, a celluláris jelátviteli rendszerben fontos szerepet betöltő izomspecifikus calpain-3 aktivitását és ezzel egyidejűleg fokozzák a dystrophin „surrogate” molekula az ún. utrophin expresszióját ami a dystrophinopathiák kezelésében kívánatos.

A dysferlin konzervált strukturájú transzmembrán fehérje, mely a sarcolemma és a cytoplasmikus vesiculák membránján lokalizálódik, deficienciáját a *DYSF* gén hibája okozza. Az AR öröklődésű betegség két különböző szindrómában (LGMD2B vagy Miyoshi típusú distalis myopathia) jelentkezhet. A klinikai kép egy családon belül is változhat, a két betegség egymás allélikus variánsának tekinthető. A Miyoshi-myopathiában az izomgyengeség az alsó végtag hátsó kompartmentjében kezdődik, és csak később terjed át a proximális végtagizmokra. Az LGMD első tünetei a kacsázó járás, a lépcsőn járási nehezítettség, fokozott lumbális lordosis, majd scapula alata, vádli hypertrophia alakulhat ki a proximalis túlsúlyú progresszív izomgyengeség mellett. A distalis izmok és a szívizomzat csak a betegség késői stádiumában károsodnak. A betegség molekuláris alapja a *DYSF* gén homozygóta vagy compound heterozygóta mutációja.

Az izomdystrophiák state of the art diagnosztikája

LGMD esetén az izombiopszia elengedhetetlen a diagnózis felállításához. A szövettani vizsgálat az izomdystrophia nem specifikus jeleit mutatja: az izomrost kaliberek kóros mértékű ingadozását, a belső magok és az endomysialis kötőszövet felszaporodását, számos necrotikus és regenerálódó rostot. Az oxidatív enzimreakció fokálisan csökkenhet, lobularis rostok jelenhetnek meg. Az immunhisztokémiai vizsgálattal számos protein jelenlétét kell vizsgálnunk, mint a dystrophin komplex tagjai: dystrophin, α -, β -, γ -, δ -sarcoglycan; egyéb plasma membrán proteinek: caveolin-3, dysferlin, alpha7 integrin; az extracellularis matrix fehérjék: merosin, collagen VI; a belső nukleáris membrán proteinek: laminA/C, emerin; sarcomerikus proteinek: telethonin. A calpain 3 és a myotilin deficienciát csak Western blottal lehet igazolni. A glycosylációs defektusokra (fukutin, *FKRP*, *POMGnT*, *POMT1*, *LARGE* deficiencia) a glycosylált α -DG hiánya utal, melyet mind immunhisztokémiai vizsgálat, mind Western blot igazolhat. A *TRIM32* mutáció által okozott sarcotubularis myopathiára az elektronmikroszkóppal látott tágult sarcotubulusok hívják fel a figyelmet. Genetikai vizsgálatot minden esetben csak célzottan érdemes végezni, azaz, ha az előzetes szövettani vizsgálat és Western blot alapján sikerült identifikálni a protein deficienciát. Duchenne/Becker típusú izomdystrophia esetén a jellegzetes klinikai kép segítheti a klinikust, hogy a dystrophin gén analízisét válassza elsőként az invazív izombiopsziát elkerülve. Ha a genetikai vizsgálat nem igazol a dystrophin génben deléciót csak akkor szükséges az izombiopszia immunhisztokémiai feldolgozása. Amennyiben a dystrophin festés egyenetlen az izomrostok felszínén és extrajunctionalis utrophin expresszió figyelhető meg minden esetben kötelezően elvégzendő a dystrophin Western blot a dystrophin deficiencia igazolására. Esetenként az egyes sarcoglycanok hiánya is okozhatja a sarcolemmalis dystrophin festés egyenetlenségét.

Izomdystrophiák molekuláris terápiája – státusz 2010

A genetikusan determinált betegségekben a genetikai hiba 4 féle módon vezethet a betegség kialakulásához. 1.) a genetikai defektus és az eredményeként kialakuló downstream genetikai mechanizmusok zavara; 2.) a fehérje termék teljes vagy részleges hiánya, vagy funkcionális rendellenessége; 3.) a kóros proteinek expresszálo sejtek, szövetek rendellenessége; 4.) a kóros sejt-ill. szövetszintű károsodás következtében olyan klinikai tünetek megjelenése, amely lehet egy adott betegségre specifikus vagy nem specifikus. Az izomdystrophiák kezelése során jelenleg csak az életminőséget javító tüneti terápiák állnak rendelkezésünkre (21. Közlemény), ezért a molekuláris terápiáktól várjuk a megoldást, melyek a fenti 4 domén bármelyikére irányulhatnak (9. Közlemény). A molekuláris terápiák főbb kategóriái:

- A direkt gén replacement (GR)
- A gén expresszió módosítása
 - Elsődleges transzkript módosítása
 - Gén csendesítés RNSi és ribozymok segítségével
- A genomikus DNS módosítása vagy kijavítása
- A mutáns mRNS translációjának gátlása
- Funkcionális homológ upregulációja

Kísérleteinkben a direkt gén replacement (GR) módszerét alkalmaztuk, így annak részleteit ismertetem bővebben. A GR során a mutáns gént cseréljük normális génre. A hatékony GR-hez számos faktor optimalizálendő, mint pl. a bejuttatandó gén, a promoter, a terápiás gént hordozó vektor és a vektor bejuttatásának módja. Általában a teljes kódoló cDNS-t bejuttatjuk, bár egyes gének cDNS-e teljes hosszúságban mérete miatt alkalmatlan a génterápiára. Ilyen esetekben csonkolt cDNS-el lehet próbálkozni. A promoter, a cDNS és a polyA szignál együttesen alkotja az expressziós kazettát. A promoternak effektívnek, az illető sejtre specifikusnak kell lennie és nem árt, ha az inaktíválható is. A preklinikai kísérletekben a dystrophinopathiák génterápiájában a CMV, RSV vagy a hybrid CB (csirke beta-actin promoter és human CMV enhancer) volt a legeredményesebb. Vektorként virális és nem virális vektorok is használhatók. A vírusok az érett izomrostokat hatékonyabban transzfektálják, mint a nem virális vektorok. Egyes vírusoknak kicsi az insert kapacitásuk, és nagyon drága a megfelelő minőségben és mennyiségben való előállításuk. A kapacitás növelésére olyan vírus konstrukciókat dolgoztak ki, melyek nem tartalmazzák az eredeti virális DNS-t (ún. gutted vírus). A dystrophinopathiák kezelésében eddig a legsikeresebbnek a teljes dystrophin cDNS-t tartalmazó ún. „gutted” adenovírus konstrukció bizonyult. Ezt nehéz előállítani, tisztítani és az érett izomrostokat rossz hatékonysággal transzfektálja. Az adenoasszociált vírus insert kapacitása sokkal kisebb, mint az adenovírusé, de könnyebb előállítani és az érett izomrostokat is jó hatékonysággal transzfektálja. Mindkét vírus konstrukt erősen immunogén.

A nem virális vektorok, mint pl. a plazmidok könnyen és költséghatékonyan előállíthatók, nem toxikusak, nem immunogének, azonban önmagukban alkalmazva rossz a transzfekciós effektivitásuk. A transzfekció hatékonyságát fizikai módszerekkel, elektroporációval, sonoporációval lehet javítani. Az elektroporáció és sonoporáció során is az izomrost membrán permeabilitása növekszik, és ez teszi lehetővé a vektorok izomsejtekbe való könnyebb diffúzióját. A sonoporáció hatékonyságát a vektorral egyidejűleg bejuttatott speciális microspherák tudják fokozni, mert az UH hatására a kezelt szövetek hőmérséklete lokálisan emelkedik; a microsphaera oszcillációja a szomszédos folyadékokat mozgásba hozza, és ezáltal a sejt membrán mentén mikroáramlások keletkeznek; a túlfűtött microspherák robbanása a sejt felszíni membránban folytonosság hiányokat eredményez. Ezeknek a mechanizmusoknak köszönhető a sejt felszíni membrán permeabilitásának fokozódása, a vektor/transzgén konstrukt effektívebb bejutása. Sonoporációs mdx egér kísérletek kollaterális károsodás nélkül relative jó transzfekciós hatékonyságot igazoltak. A terápiás gén bejuttatásához szükséges cavitatio indukcióra az <1MHz frekvencia tűnik a legalkalmasabbnak. Kísérleteink során mind az elektroporációval, mind a sonoporációval kombinált plazmid mediálta géntranszfert befolyásoló faktorokat és a beavatkozások humán alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

Az egyéb génterápiás módszerek irányában is intenzívek a kutatások. Ezek közül az ún. morpholino segítségével kivitelezett exon skipping és a stop kodon átolvasását lehetővé tevő PTC1,2,4 kezelés már elérte a klinikai vizsgálatban való alkalmazást. Ezek a génterápiás beavatkozások a személyre szabott orvoslás klasszikus példái, hiszen nem alkalmazhatóak valamennyi DMD-s kisfiúban, mivel csak bizonyos gén defektusok korrekcióját teszik lehetővé. Az exon skipping az antisense oligonucleotidok (AO) által mediált potenciális terápiás beavatkozás, mely segítségével a dystrophin

gén „out-of-frame” mutációját „in-frame” mutációvá lehet alakítani. Ezáltal a súlyos DMD fenotípusból kevésbé súlyos Becker fenotípus lesz. A beavatkozás következtében csökkent dystrophin molekula keletkezik. A klinikai vizsgálatba olyan betegek kerültek beválasztásra, akiknél a dystrophin gén deléciója az 51. exon előtt van közvetlenül, mert az alkalmazott metodika az 51. exon kivágásával javítja az olvasókeret csúsztatásával az „out of frame” deléciót in frame delécióvá. A DMD terápiájában másik áttörést ígérő módszer a PTC1,2,4 molekula alkalmazása. Ez a molekula a kóros stop kodon „átolvasását” teszi lehetővé. Azokban az esetekben van ennek a kezelési formának jogosultsága, ahol a dystrophin fehérje rendellenességét egy pontmutáció következtében keletkező kóros stop kodon alakította ki. A transzláció során a hibás stop kodon átugrása teljes hosszúságú protein keletkezését tenné lehetővé. A metodika klinikai kipróbálás előtt áll mind DMD-ben, mind cystas fibrózisban.

2.3. A hereditær neuropathiák jellegzetességei és state of the art genetikai diagnosztikája

A hereditær neuropathiák (HN) a perifériás idegrendszer heterogén csoportját képezik, előfordulási gyakoriságuk 1:2500. Klinikailag a distalis izomcsoportok atrophijával, gyengeségével és gyakran az ehhez társuló distalis típusú érzékszavarral jellemezhetők. Az ENG alapján a hereditær neuropathiák két csoportba oszthatók: 1.) meglasztott vezetési sebességgel jellemezhető demyelizációs típus. 2.) alacsony amplitudóval jellemezhető axonális típus. A klinikai kép, az ENG paraméterek és a n. suralis morfológiai jellegzetességei alapján örökletes neuropathiák között a következő fenotípusok különböztethetők meg 1.) Charcot-Marie-Tooth betegség (CMT), 2.) hereditær kompressziós paresisekre hajlamosító neuropathia (hereditær neuropathia with liability to pressure palsies – HNPP), 3.) Dejerine- Sottas neuropathia, 4.) congenitalis hypomyelinizációs neuropathia, 5.) Roussy-Levi szindróma. A HN mendeli módon, azaz AD, AR, vagy X kromoszómához kötötten öröklődhet, és ismerünk maternálisan öröklődő formákat is. A molekuláris medicina fejlődésének köszönhetően az utóbbi években felgyorsult a HN genetikai hátterének feltérképezése. Ma kb. 28 gént és 35 lókuszt azonosítottak az örökletes neuropathiákban. Ez rendkívül nehézé teszi a klinikai gyakorlatban a HN genetikai differenciáldiagnosztikáját.

Az örökletes neuropathiák hátterében álló gének

A neuropathiák hátterében álló genetikai rendellenességek érinthetik a myelinhüvely felépítésében játszó struktúrproteineket, a myelin transzportjában aktív fehérjéket, az axonális transzport fehérjéket, a myelinizáció kezdetéért felelős transzkripciós faktorokat, szignál transzdukciós proteineket, mitochondriális transzport proteineket, endosomához kapcsolódó proteineket, chaperonokat, a DNS egyes lánc repairért felelős faktorokat, a DNS replikációban szerepet játszó géneket, és ma még pontosan nem ismert funkciójú fehérjéket. A feno-genotípus korreláció nem szoros, de egyes gének hibái gyakrabban társulnak axonális neuropathiához (pl. mitofusin), míg mások a demyelizációs formákhoz (pl. *PMP22*, *MPZ*, *EGR2*). A HN hátterében álló legfontosabb géneket az alábbiakban foglaltam össze.

1. Struktúrproteinek

Perifériás Myelin Protein 22 (*PMP22*) – fontos membrán protein. Génje dózis szenzitív, duplikációja demyelizációs típusú neuropathiát eredményez, deléciója a myelinhüvely megvastagodásával az ún. tomacula képződésével jellemezhető HNPP (hereditær neuropathia liability pressure pulsy) kialakulásáért felelős (27. Közlemény). A *PMP22* gén pontmutációi CMT1, DSN és CHN fenotípust okozhatnak. Az AD öröklődésű HN formák kb. 70%-a *PMP22* duplikációval magyarázható. Myelin protein zero (*MPZ*) a myelin kompaktációért felelős, kizárólagosan a Schwann sejtekben expresszálódik. AD öröklődésű mutációi leggyakrabban CMT-1B típusú demyelizációs neuropathiát okoznak, de axonális CMT hátterében is írták már le. Néhány mutáció súlyos korai kezdetű neuropathiát okoz, mint a Dejerine-Sottas betegség, míg mások klasszikus CMT fenotípust alakítanak ki.

2. Myelin transzport fehérjék

A Connexin 32 (*GJB1*) egy gap junction fehérjét kódol, ami a myelinizáló Schwann sejtekben a paranodus és a Schmidt-Lanterman incisurák közelében a nem-kompakt myelinben expresszálódik.

Feladata az adaxonális és perinukleáris cytoplasma közötti radialis diffúzió elősegítése. XR módon öröklődő mutációi a CMT fenotípusok kb 10-20%-ért felelősek.

3. Axonális transzport fehérjék

A neurofilamentum könnyű lánc (NEFL) a neurofilementum egyik alegységét kódolja, mutációja AD módon öröklődik. A „kinesin family member” 1B (KIF1B), egyes organellumok microtubularis transzportjáért felelős. Eddig egy AD módon öröklődő CMT2 fenotípusú családot publikáltak. Giant axonal neuropathy (*GAN1*): a cytoskeletális broad-komplex, tramtrack és bric-a-brac domén (BTB)/kelch repeat család tagját kódolja. AR módon öröklődő mutációja gyermekkorban kezdődő jellegzetes lábtartással és göndör hajjal járó krónikus neuropathiát eredményez.

4. Mitochondriális transzport proteinek

A mitofusin (*MFN2*) hibája az egyik leggyakoribb oka az AD módon öröklődő axonális típusú HN-nak. A mitochondriumok külső membránjában elhelyezkedő mitofusin a mitochondriális network fenntartásában, a mitochondriumok fusiójában játszik kulcs szerepet.

5. Endosomal proteinek

A Simple (endosomal/lysosomal membráne protein) AD öröklődésű CMT I-ért, a RAB7 (guanosin trifoszfát kötő fehérje, a vesicularis transzport szabályozója a késői endocytosisban), axonális típusú CMT2B-ért lehet felelős.

6. Transzkripció faktorok

Az „Early Growth Response” 2 (*EGR2*): Cys2-His-típusú cink-ujj tartalmú fehérje, ami a Schwann sejtekben expresszálódik. AD öröklődő mutációit CMT1, DSN, CHN fenotípusokkal összefüggésben írták le. SRY-related HMG-Box-containing Gén 10 (*SOX10*): egy high-mobility-group (HMG) domént tartalmazó transzkripció faktort kódol. A *SOX10* mutációját perifériás neuropathia és demyelinizációs leukodystrophia háttérében írták le.

7. Szignál transzdukciós proteinek

A periaxin (*PRX*) nukleáris lokalizációs szignál domén. AR mutációja DSN és CMT4F-et eredményez. Ezek a betegek gyakran panaszkodnak fájdalmas neuropathiáról. A myotubularin-related protein 2 (*MTMR2*): univerzálisan expresszálódó foszfatázt kódol, AR mutációja CMT1, CMT4B1 és CHN-nel hozható összefüggésbe. SET Binding Factor 2 (*SBF2*): a perifériás idegekben és a gerincvelőben expresszálódó myotubularin pseudofoszfatáz csoport egy tagját kódolja. AR mutációja főleg CMT4B2 fenotípust eredményez. N-myc Downstream Regulated Gene 1 (*NDRG1*): univerzálisan expresszálódó foszfatázt kódol. A 7 exon homozygóta C-T tranzíciója (R148X) roma alapító mutációkat ismert a Lom típusú neuropathia háttérében. *GDAP1*: a gangliosin-indukálta differenciáció asszociált proteint kódolja, ami a neuronális fejlődés signal transduktójában játszik szerepet. AR mutációja axonális típusú CMT2-t okoz.

8. Chaperonok

Heat shock protein 22 és 27 (*HSP22* és *HSP27*): mindkét gén okozhat distalis motoros neuropathiát és CMT fenotípust is. A neuropathia kialakulásának patomechanizmusa nem ismert.

9. DNS repair factor

Tyrosyl DNA Phosphodiesterase (*TDPI*): az abortív egyes szálú DNS break-et (SSB) javítja. Mutációja AR öröklődésű spinocerebellaris ataxiát okoz, amelyhez axonális típusú neuropathia társul.

10. DNS replikációban szereplő gének

Lamin A/C (*LMNA*): a nukleáris membrán alkotórésze. AD mutációja az AR öröklődésű CMT2 mellett okozhat Emery-Dreifuss szindrómát, LGMD-t, dilatatív cardiomyopathiát és familiáris lipodystrophiát.

11. Egyéb proteinek: a fentiek mellett még a kalium és klorid csatorna kotranszporter (*KCC3*) a glycyl tRNS synthetase (*GARS*) és a dynamin (*DNM*) gének mutációi is okozhatnak örökletes neuropathiákat.

Roma neuropathiák Magyarországon

Európa roma populációja kb. 9-10 millió. Jelenleg Magyarországon a romák lélekszáma csaknem egymillióra tehető. A romák népességtörténetét genetikailag alapító (ún. founder) mutációk jelenléte jellemzi. Bizonyítást nyert, hogy az endogám házasodási hagyományok következtében kialakuló korlátozott genetikai diverzitás miatt számos olyan polygén és monogén genetikai betegség iránt veszélyeztetettek, melyek a többi európai népcsoportban nem, vagy ritkán fordulnak elő. Becslés szerint minden tizedik európai roma hordoz valamilyen AR módon öröklődő neuromuscularis betegséget. Ez az adat jelzi, hogy a neuromuscularis betegségek fontos népegészségügyi kérdést jelentenek a roma etnikai csoportban. A romák körében eddig három hereditér perifériás neuropathia formát fedeztek fel: a Russe, a Lom és a congenitális cataracta faciális dysmorphia neuropathiát (CCFDN). Ezeket gyakran egyedi roma alapító mutáció okozza. A mutációk gyakoriságában jelentős különbséget találtak bizonyos roma csoportoknál, ami jelzi a genetikai divergenciát. Bulgáriát kivéve Európában eddig nem történtek a roma neuromuscularis betegségekre vonatkozó átfogó epidemiológiai vizsgálatok. Vizsgálatainkkal a fent említett roma neuropathiák hazai feltérképezését céloztuk.

A hereditér neuropathiák state of the art genetikai diagnosztikája

Az örökletes perifériás neuropathiák genetikai diagnosztikájában a tudomány jelenlegi állása alapján az alábbi stratégia követése ajánlható. Az ENG és a klinikai kép alapján történő klasszifikáció az elsődleges, ami a betegek többségét a CMT1 (demyelinizációs) és CMT2 (axonális) vagy intermediér típusba sorolja. A CMT1 típusú betegeket elsőként a *PMP22* génre és a *GJB1* mutációra teszteljük. Ezek negativitása esetén az *MPZ* és *EGR2* géneket szekvenáljuk. A CMT1 fenotípus hátterében jelen ismereteink szerint kb. 79% -ban a *PMP22* duplikációja vagy a *GJB1* pontmutációja áll. CMT2 fenotípusnál az *MFN2* gén vizsgálata választandó elsőként. Roma populációban a klinikai tünetektől függően keressük a *CTDP1* illetve *NDRG1* gének alapító mutációit. A többi ritkán előforduló gén rutin tesztelése nem várható el a gyakorló neurológustól. Egyes esetekben a klinikai tünet segíthet a target gén kiválasztásában, mint pl. periaxin mutáció - a kifejezett sensoros tünetek, a heves fájdalom; hypacusis – *PMP22* duplikáció, *GJB1*, *NDRG1* mutáció, diplopia- *EGR2* mutáció, opticus atrophia – *MFN2* mutáció, hangszalag bénulás – *GDAP1* mutáció stb.

A hereditér neuropathiák differenciáldiagnosztikájában fontos szerepet kap a szerzett immun neuropathiák elkülönítése is. A *PMP22* proteint overexpresszáló egerekben a demyelinizált idegekben a CD8+ sejtek és a macrophagok overexpresszióját is megfigyelték. Ezek a gyulladásos sejtek a myelinhüvely közvetlen közelében helyezkedtek el. *MPZ*, valamint *Cx32* mutáns egerek és immundeficiens egerek keresztezése következtében olyan egerek születtek, amelyek neuropathiája enyhébb lefolyást mutatott, mint a nem keresztezett egerek betegsége. Mindezek arra utalnak, hogy egyes genetikailag determinált neuropathiák patomechanizmusában bizonyos immunológiai folyamatok is szerepet kapnak. A klinikai gyakorlatban arra kell odafigyelnünk, hogy amennyiben az immunológiai eredetűnek vélt CMT1 fenotípus nem javul az immunszuppresszáns kezelés hatására a genetikai eredetű neuropathia minden esetben kizárandó. Az is igaz azonban, hogy egyes a szokottnál rapidabb vagy shubokban rosszabbodó hereditér neuropathia esetén az immunrendszer vizsgálata tanácsos, mert ha együttesen jelenlevő autoimmun betegség igazolódik, az immunmoduláló kezelés a betegség progresszióját lassíthatja.

Az autoimmun eredetű betegségek közül részletesebben foglalkoztunk a gyulladásos myopathiák egyik nagy csoportjával a sporadikus inclusio testes myositissel (IBM). A betegség pontos patomechanizmusa még nem tisztázott. Kialakulásában a polymyositishez hasonló immunbiológiai mechanizmusok fedezhetők fel, de annál komplexebb a kép, mert az izomsejtekben számos intracelluláris multi-protein inclusio figyelhető meg. A betegséget konformációs betegségnek is hívják, mert több protein kóros „foldingja” is igazolódott. Hasonló klinikai és hisztopatológiai képet eredményez a hereditér forma is, azonban ennek hátterében egy gén defektusa figyelhető meg. Sajnálatos módon nem csak a hereditér forma, de az immunológiai eredetű IBM sem reagál az immunszuppresszáns terápiára, a betegség gyors progressziója következtében néhány éven belül elveszítjük a betegeket.

NOTCH3 gén mutációhoz társuló neuropathia

Perifériás neuropathia egyes genetikailag determinált betegségekből szekunderen is kialakulhat. Erre irányultak vizsgálataink a CADASIL (cerebrális autoszomális domináns arteriopathia subcorticalis infarktussal és leukoencephalopathiával) szindrómában. A CADASIL rekuráló cerebrális ischaemiás epizódokkal, demenciával, pseudobulbaris paresissal, migránnal és pszichiátriai tünetegyüttesrel jellemezhető kórkép. A betegséget a *NOTCH3* gén mutációja felelős. A *NOTCH3* pontos szerepe még nem ismert, feltételezzük, hogy az embrionális korban bizonyos apoptotikus feladatokban játszik szerepet. A betegségre jellegzetes a bőr, az izom és a perifériás idegek kis véredényei simaizom sejtei környezetében levő granularis osmiophil anyag (GOM) jelenléte. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a CADASIL-ban mitochondriális rendellenességek is lehetnek. Vizsgálatainkkal arra szeretnénk volna választ kapni, hogy CADASIL-ban milyen strukturális változások alakulnak ki a n. suralisban és az izomban, és hogy ezek az elváltozások közvetlenül a *NOTCH3* gén mutációja eredményeként keletkeznek vagy esetleg a mitochondriális genom rendellenessége okozza azokat.

3. BETEGANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatok vagy a rutin diagnosztika részét képezték, vagy hatályos etikai bizottsági engedély állt rendelkezésünkre. Az alábbiakban a vizsgált beteganyagot és az alkalmazott vizsgáló módszereket foglaljuk röviden össze.

3.1 Vizsgált betegek

Valamennyi esetben a betegek és családtagjaik vizsgálata során részletes családi anamnézist vettünk föl, családfát készítettünk, a szokásos részletes neurológiai, egyes esetekben pszichiátriai vizsgálatok mellett laboratóriumi, elektrofiziológiai, morfológiai és genetikai vizsgálatok történtek. A vizsgálatok elvégzésébe és azok eredményeinek tudományos célú felhasználására a betegek beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki. Az elektrofiziológiai vizsgálatokat standard technikákkal végeztük Dantec Keypoint készülékkel (Denmark). Az mtDNS *tRNS^{Lys}* mutációkat elemző vizsgálatainkban 334 (210 nő és 124 férfi) beteg és 150 kontroll személy DNS mintáját elemeztük. A betegek átlagéletkora 39,4 év volt (nők: 40,2 év, ffi: 32,5 év). A *tRNS^{Leu(UUR)}* mitochondriális genetikai epidemiológiai vizsgálatok során A3243G szubsztitúcióját 631 (361 nő és 270 férfi) betegen vizsgáltuk. A betegek átlagéletkora 36,3 év volt (nők: 38,1 év, ffi: 34,4 év). A mintagyűjtést 1999. január és 2007. december között végeztük. A vizsgálatba Baranya, Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg megye valamint Budapest ismeretlen etiológiájú ischaemiás stroke, ataxia, maternálisan öröklődő sensorineuralis hallásvesztés, myopathia, vagy hypotonia miatt genetikai vizsgálatra küldött betegeket vontuk be, akiknél a multisztémás tünetegyüttes, a családi anamnézis és egyes laboratóriumi értékek felvetették a mitochondriális betegség lehetőségét. Az A8344G mutáció elfodrolási gyakoriságának vizsgálata során 513 beteget (302 nő és 211 férfi) vizsgáltunk. A kohortba Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg megye valamint Pest megye és Budapest feltételezeten mitochondriális betegségben szenvedő betegeket vontuk be. A betegek átlagéletkora 39 év volt. Mind a betegek, mind az egészséges kontroll személyek a vizsgálat előtt részletes felvilágosítást kaptak, amely alapján a genetikai vizsgálatba, a minták további kutatási célú megőrzésébe és az eredmények szakirodalmi publikálásába beleegyeztek. A minták tárolása az Európai Unió követelményeinek megfelelően az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet Molekuláris Neurológiai Osztály, majd későbbiekben a Semmelweis Egyetem Neurológiai Klinika, Molekuláris Neurológiai Központ neurológiai és pszichiátriai biobankjában történt, mely a NEPSYBANK részét képezi (23. Közlemény). A vizsgálatokhoz az OPNI intézeti etikai bizottsága bocsájtott ki engedélyt.

Az α -DG glycosylations vizsgálatok során 53 olyan LGMD esetet választottunk ki a Montreal Neurological Institute és az OPNI Biobankjából, melyekben a diagnózis a korábban elvégzett rutin vizsgálatok során nem született meg (dystrophin, calpain-3, dysferlin, caveolin, a 4 sarcoglycan és a myotilin deficiencia nem igazolódott).

A Fázis I sonoporációs vizsgálatok során 5 egészséges férfi önkéntest vizsgáltunk. Az önkéntesek írásban nyilatkoztak, hogy semmilyen betegségben nem szenvedtek, gyógyszert nem szedtek és önként vállalták a vizsgálatban való részvételt. A vizsgálatot az ETT-TUKEB engedélyezte.

3.2. Alkalmazott módszerek

3.2.1 PET és Doppler vizsgálat

Az FDG (2-(18F)-fluoro-deoxy-D-glucose) felvételt PET segítségével 5 betegben (3 férfi 2 nő), átlagéletkor 35 ± 7 év vizsgáltuk. A PET méréseket GE 4096 Plus teljes test pozitron kamera segítségével végeztük. Az FDG tracet 30 perccel a mérés előtt iv. adtuk be, dózisa: 4.35 ± 2.33 mCi, vagy 59 ± 27 (Ci/tskg) volt. A PET felvételeket Hanning filterrel rekonstruáltuk, az eredményeket kontroll csoporthoz hasonlítottuk. A betegek eredményeit egy 4 nőből és 1 férfiból álló kontroll csoport eredményeihez hasonlítottuk. Átlagéletkoruk 33 ± 9 év, beadott FDG dózis 4.35 ± 2.33 mCi vagy 59 ± 27 Ci/tskg volt. A PET vizsgálatok sensoros deprivációban készültek, az adatgyűjtés 30 percig tartott. Minden PET képet a komputerizált Human Brain Atlas (HBA) rendszerbe továbbítottunk. Első lépésben az individuális PET felvételeket méret és alak szerint illesztettük a standard HBA agy kontúrhoz ld. www.dhbr.neuro.ki.se/Hba/index.html. A betegek állapota miatt az arteriás vérvétellel járó kvantitatív PET méréseket elhagytuk, helyette az agyi radioaktívítási adatokat normalizáció technikával pszeudokvantifikáltuk. Az egyes sugárzási arányt felvételenként normalizáltuk a Roland által leírt módszer szerint. A cerebrális CMRglu metabolizmus arányát az egyes központi idegrendszeri régiókban a kontroll csoport átlag sphericus volumen-of interest-jéhez (VOI) hasonlítottuk 10 mm-es átmérőben. Az anatómiai régiók azonosítása a HBA standard agy és adatbázis alapján történt. A cerebrovascularis reserve kapacitást transcranialis Dopplerrel (TCD) vizsgáltuk 15 mitochondriális betegségben szenvedő betegben és 18 egészséges kontrollban. A betegeket 3 csoportba osztottuk: (1) interictalis mitochondriális encephalomyopathia, lactacidosis és stroke-szerű epizódok (MELAS), (2) krónikus progresszív ophthalmoplegia externa (CPEO), és (3) mitochondriális myopathia, neuropathia (MM). A diagnózis a klinikai fenotípuson, hisztokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatokon alapult. Az a. cerebri mediák cerebrális vérátáramlási sebességét (CBV) TCD-vel mértük 1 g intravénás acetazolamide adása előtt és után. Az MCAV-t, a pulzatilitási indexet (PI) 45, 50, 55 mm mélységben mértük nyugalomban és 20 perccel az acetazolamide adását követően 5 perces intervallumokban. Minden csoportban mindkét a. cerebri mediában az átlagos sebességet értékeltük. Mindhárom csoport MCAV értékeit egymáshoz, illetve az egészséges kontrollhoz hasonlítottuk. A variancia analízist az egyes csoportok közötti különbség megállapítására használtuk ($p < 0.05$). A cerebrovascularis reaktivitást (CR) és cerebrovascularis reserve kapacitást (CRC) a következők szerint kalkuláltuk: $CR = 100(v_t - v_0)/v_0$; $CRC = 100(v_{max} - v_0)/v_0$, ahol $v_0 = v$ sebesség acetazolamide adminisztráció előtt, $v_t =$ sebesség acetazolamide adminisztráció után, $v_{max} =$ maximalis sebesség acetazolamide injekció után.

3.2.2. Morfológiai vizsgálatok: fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok

Fénymikroszkópia

Az izom- és ideg biopszia értékelésekor a rutin standard hisztológiai, hisztokémiai, immunhisztokémiai fény- és elektronmikroszkópos metodikákat alkalmaztuk. Az izomdystrophiák immunhisztokémiai/Western blot vizsgálataihoz a következő monoclonalis antitesteket (Novocastra) használtuk: dystrophin (NCL-DYS1,2,3), α -, β -, γ -, δ -sarcoglycan (NCL-SARC) hyperglycosylált α -DG (VIA4-1), merosin, laminin, dysferlin, collagen VI, dysferlin (NLC-Hamlet) caveolin-3, calpain (NCL-CALP-2C4) a gyártók által javasolt kondíciók szerint. Néhány szelektált LGMD esetben a növényi lektinek, mint a búzacsíra agglutinin (WGA 1:100), és mogyoró agglutinin (PNA 1:100) jelenlétét is vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. A primer ellenanyaggal történő inkubálás után egér-ellenes biotinnal (DAKO) és streptavidinnel (DAKO) kezeltük a mintákat, majd azt diaminobenzidin (DAB) segítségével vizualizáltuk. A lektin kötést tormaperoxidáz streptavidin-DAB reakcióval vizualizáltuk. A Western-blot során az izomprotein-homogenizátumot 8%-os poliakrilamid gélen szeparáltuk, majd PVDF membránra (BioRad) blottoltuk, és az elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk. Szekunder antitestként anti egér biotint (DAKO) és streptavidint (DAKO) használtunk. A blot detektálása ECL Plus kittel (Amersham) történt a cég által javasolt feltételek mellett.

N. suralis morfometria

A neuropathia súlyosságát komputerizált morfometriás program segítségével állapítottuk meg (Video Image Processing Evaluation and Recording System - VIPER, Gesotec Darmstadt, Németország). A myelin felület/endoneurális felület százalékos arányát, a myelinizált rostok mm^2 -kénti számát, az axonok felületének és a teljes idegrost felületének arányát határoztuk meg.

Elektronmikroszkópos vizsgálatok és morfológia

Az ultravékony metszeteket uranyl acetáttal és ólomcitráttal kontrasztoltuk és Philips T 400 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A n. suralis és az izomszövet kis véredényeinek endothel sejtjeiben, pericytáiban és simaizom sejtjeiben számoltuk a mitochondriumok számát, 20-20 mitochondriális betegben és 4-2 kontroll esetben. Két egymástól független vizsgáló végezte a számolást. A mitochondriumok keresztmetszetének felületét és az azt tartalmazó sejt felületét mértük, valamint azok arányát számítottuk szemiautomatikus komputerizált morfológiai rendszerrel. A statisztikai analízis a Wilcoxon teszttel történt.

3.2.3. Molekuláris biológiai metodikák

Mitochondriális betegségek vizsgálata során alkalmazott módszerek

DNS izolálás

A DNS-t vérből, illetve vázizomból izoláltuk Qiagen Blood és Qiagen Tissue Kit segítségével a gyártó által megadott instrukciók szerint. A DNS koncentrációt UV spektrofotométer segítségével 260 nm abszorbananciánál mértük. A tisztasági fokot a 260 nm-es és a 280 nm-es abszorbanancia értékek hányadosával határoztuk meg.

PCR-RFLP vizsgálat

Az mtDNS leggyakoribb mutációit PCR-RFLP módszerrel vizsgáltuk: az mtDNS nt 3160-3296, nt 8155-8367, nt 8345-10011, nt 8105-8536 régióit PCR segítségével amplifikáltuk. A primerek szekvenciái a www.molneur.eoldal.hu honlapon olvashatók. Az A3243G, A8344G, T8356C, T8993C, T8993G szubsztitúciók kimutatására a kapott PCR terméket 37°C-on restrikciós endonukleázokkal (HaeIII, BanII, HpaII, AvaI) emésztettük. A restrikciós mintázatot 2%-os agaróz vagy 12%-os poliakrilamid gélen analizáltuk. A géleket etídium-bromiddal festettük, majd a kapott band-ek nagyságát a hasítatlan mintához viszonyítva Quantity One Software (BIO-RAD) segítségével határoztuk meg.

DNS bidirekcionális szekvenálás

Az mtDNS tRNS-eit és azokat a protein kódoló géneket, ahol az irodalomban gyakran találtak patogén mutációkat PCR-rel amplifikáltuk. A primerek szekvenciái a www.molneur.eoldal.hu honlapon olvashatók. A PCR terméket Sure Clean Plus kit (BIOLINE) segítségével tisztítottuk. A tisztított PCR termékhez 1 unit 3.1. Big Dye Terminator enzimet adtunk (Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing RR-24, Applied Biosystems), valamint ugyanennyi térfogat Big Dye puffert, amely a fluoreszcensen jelölt didoxinukleotidokat is tartalmazta. A szekvenáló reakciót az illető régióra specifikus reverz primerekkel végeztük el. A szekvenáló PCR elvégzése után a termékeket NucleoSeq kit (BIOLINE) segítségével tisztítottuk. A kérdéses régiót ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer szekvenátorral vizsgáltuk. A kapott szekvenciákat is az NCBI Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) segítségével a humán mitochondriális referencia genom nukleotid és aminosav sorrendjével hasonlítottuk össze. A nukleáris genom *RRM2B* gén szekvenálás primereinek szekvenciái is a www.molneur.eoldal.hu honlapon olvashatók.

Fibroblast tenyésztés: A bőrbioptatum fibroblasztjait izolálást követően Dulbecco által módosított Eagle mediumban (DMEM) tenyésztettük (GIBCO, Invitrogene GmbH, Austria) 20% foetalis marha serum (GIBCO), 0.5% penicillin-streptomycin (GIBCO), és 0.3% Fungisone (GIBCO) jelenlétében 37 °C –on 5% CO₂ 95% levegőt tartalmazó légterben.

Légzési lánc komplex aktivitás meghatározás: A mitochondriális komplex I aktivitást Enzyme Activity Microplate Assay Kit (MitoScience, Eugene, Oregon, USA) segítségével mértük a gyártó által megadott instrukciók szerint. A Komplex I aktivitás mérés alapját a NADH-nak a NAD⁺-á oxidációja és a jelölő anyag szimultán redukciója képezte. A jelölő anyag redukcióját a 450 nm-en észlelt fokozott adszorbanancia jelezte.

Linkage analízis

A linkage analízis genom-wide scannel készült a 6,090 SNP-t tartalmazó Illumina Infinium HumanLinkage-12 panel (Illumina Inc, San Diego, CA) alapján. A MERLIN program segítségével végzett multipoint LOD score analízisbe 9 beteg és 3 egészséges családtagjainak mintája került be. Az analízis során AD öröklődésmenetet, teljes penetranciát és a fenokópiák hiányát tételeztük föl. A betegség allél frekvenciáját 0.001-nek adtuk meg. Valamennyi marker allél frekvenciáját azonosnak becsültük.

A heteroplasmikus nőstény egerek genotipizálása

A heteroplasmikus egerek Dr. Eric Shoubridge laboratóriumából származtak. Az egerek az NZB és BALB egerek mtDNS-eit tartalmazzák. A genotipizálás RFLP metodikával történt, az *RsaI* hasítási helye a 3691 nt-nál az *ND1* génben csak a BALB típusban van jelen, az NZB egérben hiányzik. Az egyes egerek heteroplasmia arányát a farokbiopszia mintából határoztuk meg. A PCR összeállításnál és a ciklus kondíciók beállításánál Jenuth et al (Nat. Genet., 14, 146–151) módszerét követtük.

A heteroplasmikus egér oocyták és az embryok izolálása

Hat hetes – 4 hónapos egerek ovulációs metafázis II oocytáit izoláltuk. Ismert heteroplasmia szintű nőstényeket intraperitonealisan terhes kanca szérum gonadotropinnal (Sigma, Canada) szuperovuláltuk, majd 5 IU hCG –t (Sigma) adtunk 44–48 órával később. Az oviductusokat 16-18 óra múlva eltávolítottuk és az oocytákat az oviductus duzzadt ampullájából HEPES-pufferrel és kaliummal optimalizált médiumba juttattuk ki. Korai stádiumú embryok nyeréséhez a szuperovulált egereket CB1 egerekkel pároztattuk egy éjjelen át. A 2-, 4- és 8-sejtes embryokat a terhes egerek oviductusának átfújásával a megtermékenyítést követő 1.5, –2 és –2.5. napon nyertük. Az embryokat 1 vagy 2 napon át in vitro tenyésztettük mielőtt szétválasztottuk a blastomereket. A tenyésztés re-equilibrált friss KSOM mediumban történt paraffin olaj alatt at 37°C-on 5% CO₂-ban.

Blastomer kollekció

Az oocyták és az embryok zona pellucidáját savas Tyrode oldattal (pH 2.5) történő inkubációval oldottuk. Minden oocyta első polár testjét aspiráltuk és 5 µl of alkalikus lysis puffert tartalmazó PCR csőbe transzferáltuk. Az ooplasma egy separált csőbe került. A zona mentes embryokat 5 percig Ca²⁺- and Mg²⁺-mentes mediumban inkubáltuk, majd a szeparált blastomereket lysis puffert tartalmazó PCR csőbe helyeztük. A blastomer lysis 15 percig 65°C- ra melegítéssel történt, melyet követően 5 µl neutralizáló puffert adtunk az DNS-t tartalmazó oldathoz.

Az oocyták, polar testek és blastomerek mtDNS genotípusának meghatározása

Az egyes sejttípusokból más és más mennyiségű lysatumot használtunk a PCR reakcióhoz. Az oocytákhoz 1 µl, a polar testekhez 3 µl, a szeparált blastomerekhez 2 µl-t lysis puffert adtunk. Minden kísérletben volt negatív kontroll, amely 5 µl bideszt. vizet jelentett. Minden mérés duplikátumban történt. A mérés során az egerek genotípusának meghatározásánál leírt módszert követtük. Az RFLP és a gélelektroforézis a "Heteroplasmikus nőstény egerek genotipizálása" fejezetben leírtak szerint történt.

A blastomerek, oocyták, polar testek radioaktív géljeinek értékelése

A géleket Storm PhosphorImagerrel (Molecular Dynamics) értékeltük. Az NZB mtDNS százalékos arányát az RFLP hasítási mintázatból kalkuláltuk. Az mtDNS NZB heteroplasmia %-os arányát minden sejtre kiszámítottuk, a duplikátumhoz hasonlítottuk és ezt követően variációs koefficient számítottunk (CV). Ha a duplikátum CV-ja <10 volt, az eredményt elfogadtuk, ha a CV-je >10 volt, triplikátum is készült. Ha a triplikátum CV-je is >10 volt, a mintát kizártuk az elemzésből.

PMP22 gén duplikáció/deléción meghatározás

A *PMP22* gén duplikációját real-time PCR módszerrel határoztuk meg (ABI 7300) standard metodika szerint (Aarskog et al. Hum Genet 2000;107:494-498). Minden mintát triplikátumban futtattuk le. A PCR az ABI Prism 7700 Sequence Detection Systemen (Applied Biosystems) futott. A *PMP22* duplikációt a komparative Ct módszerrel határoztuk meg.

Roma neuropathiák vizsgálata

A Lom neuropathiában az *NDRG1* gén alapító (R148X) mutációját PCR –RFLP módszerrel Echaniz-Laguna et al. (Neuromuscul Disord. 2007;17:163-168) metodikája szerint végeztük el. A CCFDN neuropathiában a genetikai analízis PCR-alapú restrikciós enzimhasítással történt a Varon et al. (Nat Genet.2003;2:185-189) által leírt metodika szerint. A mutáció következtében *CTDPI* génben a 6. exon - 6. intron junctiótól 389. bp-ral az intron irányába C-T szubsztitúció következtében az NlaIII restrikciós enzim hasítási helye elveszett.

A FKRP mutációk vizsgálata

Az immunhisztokémiai reakció során csökkent α -DG jelenlétét mutató betegek izomszövetéből izolált genomiális DNS mintán először az *FKRP* gén hot spotját (cC826A) zártuk ki Walter et al. (J Medical Genetics 2004;41:50) metodikája szerint. Amennyiben ez a mutáció nem igazolódott az *FKRP* gén kódoló régióját szekvenáltuk a standard szekvenálási metodikával.

3.2.4. Génterápiás vizsgálatok

Elektroporációs (EP) vizsgálatok

Beta galaktozidázt (beta-gal, pCBLacZ), a teljes hosszúságú (pCBMuDys), vagy rövidített dystrophin (pCMVMicroDys) cDNS-t, vagy utrophint (pCBVUtrFl) tartalmazó plazmid volt a vektorunk, melyeket a hybrid cytomegalovirus (CMV) és β -actin promoter (CMV promoter) szabályozott. Az utrophint tartalmazó plazmidban az aminoterminálishoz egy rövid nukleotid „flag tag” lánc kapcsolódott. A pCMVMicroDys microdystrophint tartalmaz, amelyből hiányzik a teljes rod domén kivéve a 2 spectrin szerű repeatet és az első és utolsó „hingat”. A végső plazmid koncentráció 1-3 μ g DNS/ μ l volt.

Kezelt állatok, plazmid injekciók és euthanasia: újszülött (4-6 napos) és felnőtt (6-8 hetes) normális (CD1 and C57BL/6), immunodeficiens (SCID) és mdx egereket használtunk a vizsgálatokhoz. Minden csoportban 4-8 állat volt. A m. tibialis anteriort (TA) vagy a gastrocnaemiust injektáltuk a fenti plazmidok egyikének 20-50 μ l-vel. Egy kohortban a plazmid injekciót megelőzően 0,4 U/ μ l hyaluronidaset (Sigma Aldrich) is injektáltunk. Egy további kohortban 100 μ l PBS-ben hígított Evans Blue-t (10 mg/ml) fecskendeztünk intraperitonealisán mielőtt a plazmidot injektáltuk. Minden csoportból 4-6 állatot altattunk el 10, 30, 90, 180 és 360 nappal a kezeléseket követően.

Elektroporáció (EP): Az injektált izmokat transzkután EP-val kezeltük (felszíni elektród, 8 db négyszög impulzus, 175-1800 v/cm feszültség, 0, 2-20 msec közötti változó időtartam).

A mintavétel és a végpontok meghatározása: A teljes TA-t és gastrocnaemiust eltávolítottuk, majd fagyasztott metszeteket készítettünk. A hisztológiai elemzés során az alábbi paramétereket analizáltuk: a transzfekált rostok száma és aránya (β -gal, dystrophin és utrophin pozitivitás), az Evans Blue pozitív rostok száma és aránya, a necrotikus rostok prevalenciája, a β -gal aktivitás luminometriás mérése 10, 90, 180 és 360 nappal az EP után. A plazmid partikulumok mennyiségét Real-Time PCR-el mértük QuantiTect Probe PCR kit segítségével (Taqman próba, Qiagen, Valencia USA) a CB promoter régióhoz kötődő FAM és TAMRA jelölt primerekkel). A rágcsló adiposin gén szolgált kontroll génként. A reakciót a SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) készüléken futtattuk.

Az Evans blue, β -gal, dystrophin, vagy utrophin pozitív rostok, és a necrotikus rostok teljes számát számoltuk minden kezelt izomban. Minden csoportban az arithmetikus átlagot és a standard hibát kalkuláltuk majd a Student és GLM ANOVA 2 tail T tesztjét alkalmaztuk.

3.2.5. Sonoporációs vizsgálatok

A vizsgálat során az önkéntesek bo. m. biceps brachii-jába 0.75-1.5 ml fiziológiás sóoldatot injektáltunk, a jo. m. biceps brachii-ba, pedig előzetes Vialmixx-el történő rázással történő aktivációt követően 0.75 ml azonos térfogatú fiziológiás sóval hígított Definity (microbubble) oldatot fecskendeztünk. Az injekciókat követően azonnal alkalmaztuk a sonoporációt (SonoEnGene), mely paraméterei a következők voltak: felszíni 5 cm átmérőjű elektród, frekvencia: 1 MHz, időtartam: 2 min, duty cycle: 30%, intenzitás: 2-3 W/cm². A sonoporációt követően obszerváltuk az önkénteseket, majd 36 órával később szérumban CK kontroll és mindkét m. biceps brachii-ból izombiopszia történt, melyet a fentiekben leírt morfológiai módszerekkel vizsgáltunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Mitochondriális betegségek

4.1.1. Új mtDNS rendellenességek, új mtDNS betegségek leírása (5., 6., 8., 11., 31. Közlemény, 4., 25. Absztrakt)

1. Kearns-Sayre szindrómás betegünknek (28 éves) gyermekkor óta volt szemmozgás-zavara, melyhez 20 éves korában bilaterális ptosis és látászavar társult. Izombiopsziája mitochondriális betegségre jellegzetes szövettani képet talált. Az mtDNS analízis során a WISP-PCR-al a H 16569 and L 14571 primer pár alkalmazásakor egy 0.8 kb nagyságú mtDNS szakaszt amplifikálódott, az illető régióban egyes nagy deléció jelenlétét jelezve. Annak bizonyítása céljából, hogy a PCR termék deléciós „junction fragment”, a forward primer pozícióját 1000 bp-ral 5' irányban előrébb választottuk meg L 13571-nél és ekkor egy 1800 bp nagyságú mtDNS szakasz amplifikálódott. Így az 1.2 kb kiterjedésű deléció jelenlétét primer shift PCR-al verifikáltuk. A szekvencia analízist csak a H 16569 reverse primer használatával tudtuk elvégezni, mivel nem állt több DNS rendelkezésünkre. Így csak a 16100-16569 nukleotidok közötti szekvencia meghatározására volt lehetőségünk. A „junction fragment” legalább 750 bp nagyságúnak mutatkozott, a deléciós töréspont baloldalon a 14591-14952 bázispárok közé, jobb oldalon pedig a 15739-16100 nukleotidok közé volt lokalizálható. Ennek megfelelően a deléció magában foglalta a cytochrome b génjének 70 %-át, az I. komplex 5. alegység (ND5), a *tRNA^{Glu}*, a *tRNA^{Thr}*, *tRNA^{Pro}* génjeit. A közleményben elsőként írtunk le egyes nagy deléciót az mtDNS ezen régiójában (8. Közlemény).

2. Hatvenegy éves férfi betegünk évek óta súlyos izomgörcsökről számolt be, mely háttérében az elektrofiziológiai vizsgálattal polyneuropathia igazolódott. Polyneuropathiája következtében neurogén hólyag és szekunder anuria is kialakult. A szövettani vizsgálat az izomban neurogen károsodást és klasszikus mitochondriális eltéréseket, a n. suralisban axonális típusú neuropathiát talált. Az mtDNS analízise WISP-PCR analízissel és primer shifting-el a 6570 és 14150 nt között egyszeres óriás deléciót detektált. A heteroplasmia foka 30% volt. A deléciót egy 400 bp nagyságú un. „bridging fragment” hidalta át. Az irodalomban először igazoltunk heteroplasmikus egyes nagy deléciót mitochondriális myopathia- neuropathia háttérében (5. Közlemény).

3. Egy infantilis myopathiában szenvedő gyermek *tRNS^{Leu(UUR)}* génjében több pontmutációt is detektáltunk. A gyermek légző izmait is érintő generalizált hypotoniás izomgyengesége miatt élete 4. napjától kezdve állandó asszisztált lélegeztetésre szorult. Mozgásfejlődése meglassult, járni soha nem tanult meg. Öt éves korára a hypotonia csökkent, mozgásai javultak, kezeit használta, megült, de légzőizmai változatlanul elégtelenül működtek. A gyermek mentálisan retardált volt. A hisztológiai vizsgálat súlyos mitochondriális myopathiát talált. Több degenerált izomrostot a myofibrillaris hálózatot destruáló patológiás szerkezetű mitochondriumok töltöttek ki. A n. suralisban csak enyhe aspecifikus eltérések voltak. Az izomból izolált mitochondriális genomon csaknem homoplasmikusan találtunk pontmutációt a *tRNS^{Leu(UUR)}* génben a 3259., 3261., 3266. és 3268. nukleotidoknál. A mutációk közül kiemelendő a *tRNS^{Leu(UUR)}* gén anticodonjában az A3266G báziscsere, mivel ez egy erősen konzervált hely és a mutáció következtében a Leu(UUR) genetikai kód Ser(UCN)-né alakult át. A mutációk csak a gyermek izomszövetében voltak jelen. A vérből izolált DNS vizsgálata során egyik mutációt sem találtuk meg, mint ahogy azokat nem találtuk a gyermek maternális ági felmenőinek vérében sem (6., 11., Közlemény, 4. Absztrakt).

4. Súlyos dystoniában szenvedő 16 éves fiú betegünk klinikai tünetei 9 éves korában felsőlégtüti infekciót követően kezdődtek. Akkor szérumban laktát szintje magas volt, lumbális liquorában emelkedett fehérje szintet találtak. Jelenleg a dystonia miatt anarthriás, a végtagokban jelentkező dystonia mozgásában súlyosan korlátozza. Vizsgálatakor a nyelvre és a végtagokra kiterjedő generalizált dystonia mellett anarthriás beszédet, diffúz vázizom atrophíát és hiányzó reflexeket találtunk. EMG vizsgálata neurogén károsodást igazolt. Az EEG, ENG és a koponya MRI kóros eltérést nem talált. Az izombiopszia során enyhe neurogén károsodást, a rostok 6%-ban módosított SDH festéssel ragged blue, valamint COX festéssel COX negatív rostokat láttunk. Az elektronmikroszkópos vizsgálat számos izomrostban subsarcolemmális mitochondriális akkumulációt talált. Édesanyjának

Gén	Nt pozíció	Nt csere	A.sav csere	Forma	III/2	III/1	II/1	Minősítés	Irodalom
HVS1	16126	T > C	-	Homopl.	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Dirienzo és Wilson, 1991</i>
HVS1	16140	T > C	-	Homopl.	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
HVS1	16183	A > C	-	Homopl.	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Lahermo et al., 1996</i>
HVS1	16189	T > C	-	Heteropl	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
HVS1	16209	T > C	-	Homopl.	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
HVS1	16294	C > T	-	Homopl.	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
HVS1	16296	C > T	-	Homopl.	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
HVS1	16311	T > C	-	Homopl.	+	+	+	Polymor- phizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>

4.1. Táblázat A mtDNS HVS1 régióban talált eltérései a vizsgált családban

Gén	Nt pozíció	Nt csere	A.sav csere	Forma	III/2	III/1	II/1	Minősítés	Irodalom
<i>ND1</i>	4216	T>C	Tyr/His	Homopl.	+	+	+	Nem szinoním szubsztitúció	<i>Torroni et al., 1999</i>
<i>NC7</i>	8270	C>T	-	Homopl.	+	+	+	Szinoním szubsztitúció	<i>Ruppert et al., 2004</i>
<i>NC7</i>	Del nt 8271-8280	-	-	Homopl.	+	+	+	Szinoním szubsztitúció	<i>Lorenz és Smith, 1994</i>
<i>tRNS Lys</i>	8332	A>G	-	Heteropl	55 %	17 %	35%	Patogén mutáció	
<i>tRNS Lys</i>	8347	A>C	-	Homopl.	+	+	+	Nem szinoním szubsztitúció	<i>Coon et al., 2006</i>
<i>ATP6</i>	8697	G>A	-	Homopl.	+	+	+	Szinoním szubsztitúció	<i>Rieder et al., 1998</i>
<i>tRNS Arg</i>	10463	T>C	-	Homopl.	+	+	+	Nem szinoním szubsztitúció	<i>Houshmand et al., 1994</i>
<i>ND4</i>	11812	A>G	-	Homopl.	+	+	+	Szinoním szubsztitúció	<i>Howell et al., 1995</i>
<i>ND6</i>	14520	C>G	Gly/Arg	Heteropl.	40 %	25 %	15%	Nem szinoním szubsztitúció	

4.2. Táblázat: Az mtDNS tRNS és proteinkódoló génjeiben talált eltérések a vizsgált családban

kisgyermekkorában stroke szerű epizódja volt, jelenleg hypacusisa, egyensúlyzavara van és a felső végtagjaiban enyhe dyskinesia látható, mely csak 40-es éveiben jelent meg. Audiológiai vizsgálata sensorineurális hallásvesztést, az ENG axonális neuropathiát igazolt. A proband idősebb testvérének is volt gyermekkorában stroke-szerű tünete, amely során hemiparesist, magas laktát és ammónia szintet észleltek. Jelenleg az ő végtagjaiban is enyhe dystonia észlelhető, emellett 11 éves kora óta epilepsziás és viselkedészavara van. EEG vizsgálata a bal fronto-centralis régióban epileptiform jeleket írt le. A proband szekvencia analízise a *tRNS^{Lys}* génben heteroplasmikus formában a 8332 nt pozícióban adenin guanin cserét igazolt. A mutáció a tRNS antikodon karjában helyezkedik el. Emellett a vizsgált régióban két polymorphizmus (9-bp-os deléción nt 8271-8280 és C8270T) valamint egy részben tisztázatlan jelentőségű SNP (A8347C) is jelen volt. A tRNS-ek, a proteinkódoló és a hipervariábilis régió 1 (HSV1) szekvencia analízise során további 13 SNP igazolódott (4.1., 4.2. Táblázat). A családi szegregációs vizsgálat során a beteg édesanyjánál és az idősebbik testvérénél is megtaláltuk a fenti eltéréseket. Az érintett család részletes haplocsoport analízisét elvégezve kiderült, hogy az anya és gyermekei a kelet-ázsiai populációra jellemző B haplocsoportba tartoznak. Az A8332G mutáció az irodalomból nem ismert, a 150 kontroll személy vizsgálatakor ezt a szubsztitúciót nem tudtuk kimutatni, így ezt patogénnek feltételezzük. Teóriánkat igazolja, hogy a Komplex I aktivitás valamennyi érintett családtagnál a normálisnál szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. A NADH dehidrogenáz 6. alegységét kódoló génben talált heteroplasmikus C14520G SNP sem ismert az irodalomban, de ezt az SNP-t az általunk vizsgált 150 kontroll közül 13 esetben megtaláltuk, így ezt polymorphizmusnak minősítjük (31. Közlemény, 25. Absztrakt).

4.1.2. Az A8344G szubsztitúciófenotípus variációi (28. Közlemény, 10., 21. Absztrakt)

A MERRF szindróma jellegzetes klinikai tünete a myoclonus epilepsia. Az általunk vizsgált jellegzetes A8344G MERRF mutációt hordozó betegek csak kis hányadának volt myoclonus epilepsiája, klinikumuk rendkívül változatos volt. Két MERRF szindrómás család 2 ikerpárját vizsgáltuk (egyik egypetűjű, másik kétpetűjű ikerpár). A kétpetűjű ikerpár kapcsán új fenotípust találtunk a jellegzetes MERRF mutációhoz társulva. Az egypetűjű ikerpárnál a betegség a jellegzetes MERRF szindróma formájában jelentkezett. Az ő esetük érdekessége, hogy az életkor előrehaladtával az eleinte csaknem identikus fenotípus egymástól egyre jobban eltért, mint ahogy eltért alaptünetük kezelési stratégiája is.

Új fenotípus (depresszív tünetegyüttes) társítása ismert mitochondriális mutációkkal

Egy magyar családban a 63 éves probandnak kétpetűjű iker fiait és panaszmentes lányát vizsgáltuk. A proband bátyjának, anyjának és nagybátyjának hasonló pszichátriai és neurológiai tünetei voltak. A proband húszas éveiben 3 alkalommal súlyos depressziós epizódokkal járó posztpartum pszichózis volt. Ötvenhét és 60 éves korában súlyos major depressziós epizód, anxietas, testsúlycsökkenés, suicid kényszer miatt hospitalizálták. Ötvenes éveiben észlelte végtag öv típusú izomgyengeségét, amely lassan progrediált. Fizikális vizsgálata generalizált lipomatosist, hypacusist, az izmokban enyhe atrophiat és proximális típusú gyengeséget, csökkent sajátreflexeket és törzsataxiát talált. Kognitív diszfunkciója, depresszív hangulata, közepesen súlyos anxietasa volt (Hamilton Score 35). Szérum CK-ja enyhén emelkedett. Az EMG kevert típusú károsodást észlelt, koponya MRI normalis volt. A n. suralis biopsziában enyhe axonális neuropathiát láttunk, az izombiopsziában számos ragged red és COX negatív rost ábrázolódott. Az elektronmikroszkópia intramitochondriális paracrystallin inclusiokat detektált. A 2. beteg (a proband iker fiainak egyike) fiatal felnőttkorától kezdve kifejezett szorongással járó depressziós epizódokról számolt be. Az elmúlt években enyhe kognitív diszfunkció is kialakult. Harminc éves korától progresszív végtagöv típusú izomgyengesége volt. Vizsgálatakor hypacusist, dysarthriát, súlyos végtagöv típusú izomatrophiat és gyengeséget, distalis típusú érzészavart, ataxias járást találtunk. Időnként agitált, kritikátlan, máskor depressziós (Hamilton Score: 18). A szérum CK 550U/l, a szérum laktát 6,1 mmol/l (norm≤1,8 mmol/l). Az ENG axonális típusú polyneuropathiát, az EMG kevert típusú eltéréseket írt le. Izombiopsziája mitochondriális betegségre utalt. A 3. beteg (a proband másik iker fia) 18 évesen súlyos szorongás és phobias manifesztációk miatt került kórházba. Vizsgálatakor tünetmentes. Az mtDNS mutáció analízis PCR amplifikációt követő Ban II enzimatis emésztést követően A8344G pontmutációt talált valamennyi fent leírt betegben. A heteroplasmia arány az izomban a következő volt: 82 % az 1. betegben, 79 % a 2. betegben, 63% a 3. betegben. A heteroplasmikus mutáció valamennyi beteg vérében is jelen volt, míg

az ikrek egészséges lánytestvérnek a vérében nem találtunk mutáns mtDNS molekulákat (28. Közlemény, 10. Absztrakt).

Fenotípus variáció MERRF mutációval rendelkező egyetű ikrekben

A két 30 éves férfi normális ikerterhességből született. 17 éves korukban néhány hónap különbséggel myoclonus absence-ok jelentkeztek. Neurológiai vizsgálatuk akkor a gracilis izomzaton kívül egyéb kórjelet nem talált. Laboratóriumi vizsgálat mindkettőjükénél thrombocytopeniát igazolt. Valproat és clonazepam mellett az 1. beteg gyakorlatilag rohammentessé vált, míg a 2. betegnél a testvérével azonos dózisban beállított gyógyszerek mellett is gyakran jelentkeztek a myoclonusok. A 2. beteg testsúlya 29 éves korától fokozatosan csökkent, progresszív ataxia, kognitív hanyatlás jelentkezett, majd banális infekciót követő hőemelkedést követően 2 napig tartó myoclonus státusz epilepticus alakult ki a jobb oldali végtagokban. A myoclonusok megszűnése után jobb oldali hemiparesis alakult ki, mely miatt a beteg hetekre járásképtelenné vált. Jelenleg clonazepam, valproat, levetiracetam, phenobarbital adása mellett ritkán jelentkeznek a myoclonusok, enyhe jo-i hemiparesise javult, súlyos ataxiája, fej és végtagtremora van, beszéde dysarthriás. Évente 1 -2 alkalommal vannak metabolikus krízisei, amikor az ataxia oly mértékűvé válik, hogy segítséggel is járásképtelen. Az elmúlt 2 évben kognitív hanyatlást is észleltünk, időnként depressziós. Ikerestvére clonazepam és valproat szedése mellett rohammentes és munkaképes, mindössze gracilis izomzatot, enyhe végtagtremort talált neurológiai vizsgálata. Időnként disztímiás. Mindkét beteg genetikai vizsgálata során az mtDNS 8344. nukleotidjánál A-G pontmutáció igazolódott a *tRNS^{Lys}* génben 60 és 55 %-os heteroplasmia arányban. A mutációt neurológiai tünetekkel nem rendelkező édesanyjuk is hordozza. Monozygóta iker státuszukat polymorph DNS markerekkel történő genetikai vizsgálat igazolta. A vizsgálatot a SE I. Női Klinikáján Dr. Nagy Bálint végezte el (21. Absztrakt).

MERRF mutáció következtében kialakuló MELAS szindróma

Egy 22 éves férfi betegünk anamnézisében jobb oldali n. abducens paresis szerepelt gyermekkorától. Egy maternális ági unokatestvérét epilepsia miatt kezelik. A beteg kórházi felvételére súlyos fejfájás, a jobb oldali végtagok gyengesége, érthetetlen beszéd, és meglassult pszichomotilitás miatt került sor. Neurológiai vizsgálata során diplopia, harmadfokú nystagmus, bal oldali perifériás n. facialis lesio, dysarthria, jobb oldali hemiplegia és hemihypesthesia igazolódott. Sajátreflexei jobb oldalon fokozottak voltak, iniciatíva szegény és soporozus volt. Akut koponya CT-je nem talált eltérést, míg a 24 órával később készült koponya MRI 2x1.5 cm ischaemiás lesiot talált a pons bal oldali paramedian régiójában. Az MRA az intracranialis ereken nem talált eltérést, de az arteria basilaris kanyargós volt. A fiatalkori stroke szindróma etiológiáját célzó vizsgálatok negatívak lettek (haemostasis vizsgálatok, protein S, protein C deficiencia, Leiden mutáció, antithrombin III deficiencia, prothrombin G20210A variáció, immunszerológiai vizsgálatok, echocardiographia a carotisok és intracranialis erek Doppler vizsgálata). A vér genetikai vizsgálata során az mtDNS A8344G MERRF-re jellegzetes mutációja igazolódott relative alacsony 35 % heteroplasmia arányban. A beteg állapota spontán javult, jelenleg tünetmentes. Édesanyja és testvérei vérében a szegregációs vizsgálat során a patogén mutáció az alkalmazott technikával igazolódott. Ezt magyarázhatja az esetleges alacsony heteroplasmia arány is, de a mutáció tényleges hiánya is.

4.1.3. Az mtDNS *tRNS^{Lys}* gén mutációk jelentőségének elemzése a mitochondriális betegségekben (25., 31. Közlemény, 10., 21., 25., 26. Absztrakt)

Az mtDNS-ben talán tRNS-ekben fordulnak elő leggyakrabban patogén mutációk. Az irodalmi adatok szerint a *tRNS^{Leu}* a leggyakrabban vizsgált mtDNS szakasz. A *tRNS^{Lys}* is mutációs hot spotnak számít, de ezt ennek ellenére kevesebben vizsgálták. Ezért azon betegeinknél, ahol felvetődött a mitochondriális betegség gyanúja szisztematikusan elemeztük az mtDNS *tRNS^{Lys}* génjét és a határoló szomszédos régiót. A vizsgálatot a klasszikus A8344G mutáció elemzésére alkalmas RFLP technikával kezdtük. Azon betegek esetén, akiknél az RFLP vizsgálatok nem mutattak eltérést, de a klinikai tünetek, a laboratóriumi eltérések, valamint az izombiopszia során látott morfológiai változások során a mitochondriális betegség alapos gyanúja továbbra is fennállt, a fenti pontmutációk elemzését és az mitochondriális tRNS gének szekvencia analízisét posztmitotikus szövetből (vázizom) is elvégeztük. A mutációk analízise során az A8344G szubsztitúcióra jellegzetes RFLP hasítási mintán kívül 5 egyéb különböző hasítási mintázatot észleltünk. Ezeket a fenti nukleotidot is magában foglaló

tRNS^{Lys} gén és határoló régiók szekvenálásával vizsgáltuk tovább. A szekvenencia analízis során a vizsgált 334 betegből összesen 54 esetben 10 különböző mtDNS variációt találtunk. A talált mtDNS SNP-eket és azok klinikai jelentőségét az alábbiakban ismertetem.

1. Az irodalomból ismert, bizonyítottan patogén mutációk

Az mtDNS A8344G szubsztitúciója (28. Közlemény, 10., 21., 26. Absztrakt)

A klasszikus MERRF szindrómára tipikus A8344G mutációt 13 (11 beteg és 2 kiszűrt panaszmentes hozzátartozó) esetben találtuk meg. A mutáció izolált előfordulását 9 esetben igazoltuk, valamint egy család (3 fő) esetében az A8344G nukleotid szubsztitúció mellett a vizsgált régióban további két mtDNS SNP (G8251A, A8347C) is kimutatható volt. A patogén A8344G a *tRNS^{Lys}* T-loopjában helyezkedik el a *tRNS 55. nt* pozíciójában. Az A8344G mutációt hordozó betegek klinikai tünetei változatos képet mutattak, a myoclonusos epilepsia mellett jelen volt a myopathia, nagyothallás, progresszív ophthalmoplegia externa, fiatalkori ischaemiás stroke, és mentális hanyatlás (4.3. Táblázat).

2. Az irodalomban eddig még le nem írt új patogén mtDNS A8332G szubsztitúció

A dystonia, stroke-szerű tünetekkel rendelkező család klinikumát és részletes genetikai eredményeit 4.1.1 fejezetben ismertettük (31. Közlemény, 25. Absztrakt).

3. Az irodalomból SNP-nek ismert, feltehetően neurodegeneratív betegségekre hajlamosító nem szinoním szubsztitúció

A szekvenencia analízis során a *tRNS^{Lys}* T-loopjába lokalizálódó A8347C szubsztitúciót 19 esetben találtuk meg a betegek vizsgálata során. Ebből izoláltan négy esetben, a G8251A SNP-vel kombinálva három esetben, míg további 11 esetben patogén mutációkkal együtt fordult elő. Ezt az SNP-t Coon et al. (Mitochondrion; 2006:6:194-210) Alzheimer-kóros betegekben szignifikánsabban nagyobb arányban találták meg, mint az egészséges kontroll egyénekben. A mi egészséges kontroll egyéneinkben ez a szubsztitúció nem volt jelen. Az általunk vizsgált betegek körében ennek a mutációnak a meglétét nem gondoljuk patogénnek, de nem zárjuk ki annak lehetőségét, hogy egyéb gének mutációival együtt előfordulva degeneratív központi idegrendszeri valamint izom betegségekre hajlamosíthat.

4. Az irodalomból ismert polymorphizmusok jelenléte

a.) A 9 bázispáros deléció (del8271-8280) (31. Közlemény, 25. Absztrakt)

Az mtDNS nt 8271-8280 közötti szakaszában – a *COII* és *tRNS^{Lys}* gének közti hipervariábilis intergénikus régióban - egy 9bp-os deléciót öt betegben találtunk meg, amely minden esetben a szinoním C8270T szubsztitúcióval és a homoplasmikus A8347C nem szinoním szubsztitúciókkal társult. A korábban már ismertetett dystoniás család három tagjában emellett az A8332G nukleotidcserét is ki tudtuk mutatni. A deléció kelet-ázsiai antropológiai markerként ismert az irodalomban, melyet Európában eddig nagyon ritkán írtak le. A C8270T SNP is az irodalomból polymorphizmusként ismert. Az mtDNS haplotípus analízise során (a vizsgálatot végezték Dr. Raskó István és mtsai.) 3 beteg az ősi B haplocsoportba, 1 beteg a dél-kelet Európára és a Közép-Mediterrán vidékre jellemző HV haplocsoportba, 1 pedig észak-nyugat Európában jellemző U5a1 haplocsoportba tartozott.

b.). mtDNS G8251A szubsztitúció

Vizsgálataink során a *COII* terminális szakaszában lokalizálódó G8251A szubsztitúciót 19 esetben találtuk meg. A restriktációs mintázatban a BanII enzim egyik felismerő helye kiesett, így a normálistól eltérő gélképet kaptunk. A mutáció pontos helyét bidirekcionális szekvenálással határoztuk meg. Ez az SNP az irodalomból polymorphizmusként ismert, az ősi L és N haplocsoportokra jellemző eltérés. A szubsztitúció 13 esetben izoláltan, 3 esetben az A8344G és A8347C mutációkkal együtt, míg újabb 3 esetben az A8347C mutációval kombináltan fordult elő. A kontroll szekvenciák vizsgálata során ezt a polymorphizmust három esetben találtuk meg.

Nem	Életkor	Klinikai tünetek	Myopathológiai lelet	HP %	Családi anamnesis
Ffi	33 év	Myoclonus epilepsia, fejtremor, dysarthria, ataxia, kognitív hanyatlás, depresszió, thrombocytopenia	COX negatív és ragged red rostok láthatók, megaclonalis mitochondriumok	60%	Ikertestvér myoclonus epilepsia
Ffi	33 év	Myoclonus epilepsia, végtag tremor, depresszió, thrombocytopenia	Nem történt biopszia	55%	Ikertestvér myoclonus epilepsia
Ffi	48 év	Myopathia, cardiomyopathia, polyneuropathia, ataxia, mentális hanyatlás, depresszió, szorongás	Myopathia, ragged red és COX negatív rostokkal, paracrystallin mitochondriális inclusiok	58%	Mater: súlyos myopathia, ataxia, depresszió Ikertestvér: súlyos anxietás
Ffi	48 év	Súlyos anxietas, fóbia	Minimális nem specifikus elváltozások	44%	Mater: súlyos myopathia, ataxia, depresszió Ikertestvér: depresszió, ataxia, myopathia
Nő	68 év	Depresszió, myopathia, nagyothallás, ataxia	Ragged red és COX negatív rostok, paracrystallin inclusiok	46%	Ikerfiai: ataxia, myopathia, depresszió, szorongás
Nő	51 év	TIA	Nem történt biopszia	30%	Maternális ágon: colon tumor, diabetes mellitus csecsemőhalálozás, vesebetegség Maternális ági unokatestvér epilepsiás
Ffi	24 év	Ischaemiás stroke	Nem történt biopszia	30%	
Ffi	45 év	Ptozis, myopathia, krónikus PEO, hypothyreosis	Myopathia, ragged red rostok,	40%	Negatív
Ffi	45 év	Myopathia, izomgörcsök	Myopathia, COX negatív rostok, subsarcolemmális mitochondrium halmozódás	35%	Negatív
Nő		Myositis	Polymyositisre jellegzetes szövettani kép		Anyja mutációt hordozó tünetmentes
FFi	32 é	Migrén, polyneuropathia, depresszió, beszűkült vesefunkció,	Nem történt biopszia		Anyai ágon halmozódó depresszió, migrén

4.3. táblázat: A *tRNS^{Lys}* gén vizsgálata során talált A8344G mutációval rendelkezők klinikai tünetei

c.) mtDNS G8269A szubsztitúció

A *COII/tRNS^{Lys}* régió szekvenálása során a G8269A szubsztitúció egy beteg és egy kontroll személy esetében volt kimutatható. Ez az SNP az irodalomból polymorphizmusként ismert (Rieder et al. Nucleic Acids Research.1998;26:967-973), elfordulása a nyugat-európai H4a és J1b haplocsoportokban gyakori

d.) mtDNS G8292A szubsztitúció

Három beteg vizsgálatkor a restriktációs mintázatban a BanII enzim egyik hasítási helye kiesett, így a normálistól eltérő gélképet kaptunk. A szekvencia analízis során ennek háttérében a G8292A szubsztitúció igazolódott, amely a *tRNS^{Lys}* és a *COII* közti intergénikus régióban helyezkedik el. A hármóból két esetben volt lehetőség családi szegregációs vizsgálatra, amelynek során további 5 esetben tudtuk kimutatni a kérdéses mtDNS variációt. Mindkét családban maternális halmozódású migrént találtunk. Az egyik vizsgált családban a proband tünetei közül a migrén meglete mellett kiemelendők az ismétlődő tranzienis ischaemiás attackok, a hypothyreosis és mélyvénás thrombosis. A beteg testvérének és édesanyjának epilepsziás rohamai voltak. A másik családban egy 16 éves komplikált migrénben szenvedő leány vizsgálata kapcsán derült fény az mtDNS G8292A szubsztitúcióra. A beteg szintén migrénes édesanyja is hordozza a mutációt. Az irodalomból ez a szubsztitúció polymorphizmusként ismert, amely az R0 haplocsoportot határozza meg. A G8292A szubsztitúció és a migrain kapcsolatát eddig még nem vizsgálták.

Egészséges kontroll egyének *tRNS^{Lys}* génjének vizsgálata

Az irodalomból nem ismert újonnan talált mtDNS variációk patogenitásának vizsgálatára az adott régió szekvencia analízisét 150 kontroll személyen végeztük el (67 ffi és 83 nő). Ezen csoport átlagéletkora 43,7 év volt (férfiak: 41,1 év, nők: 45,7 év). Az egészséges kontroll csoport szekvenciáit hasonlítottuk össze a cambridge-i referencia szekvenciával, majd a betegek szekvenciáival. A G8251A polymorphizmust 4 esetben, míg a G8269A SNP-t 2 személynél tudtuk kimutatni. A kontroll csoportban a szekvencia analízissel egyéb mtDNS eltérés nem volt detektálható.

A *tRNS^{Lys}* és határoló régióinak vizsgálatokor talált eltérések összefoglalása

A vizsgált régió egy heteroplasmikus mutációját (A8332G) elsőként írtunk le patogénnek, egy már ismert patogén mutáció jelenlétét (A8344G) pedig 13 esetben igazoltuk. Több betegünkben megtaláltuk a valószínűleg neurodegeneratív betegségekre hajlamosító A8347C SNP-t valamint 5 polymorphizmust és antropológiai marker jelenlétét igazoltuk. Egyes mutációk nem csak izoláltan fordultak elő, hanem néhány betegben ezek együttes előfordulása is igazolódott (26. Absztrakt).

4.1.4. Az *RRM2B* gén heterozygóta mutációjának új klinikai megjelenése: az autosomalis dominans progresszív ophthalmoplegia externa (adPEO) (30. Közlemény)

A mitochondriális betegségek nemcsak maternálisan, hanem mendeli szabályokat követően is öröklődhetnek. A PEO autosomális domináns öröklődésű változata (adPEO) háttérében eddig az *SLC25A4*, *POLG*, *POLG2*, *PEO1* or *OPA1* gének mutációit írták le. Egy európai származású észak-amerikai és egy magyar család vizsgálata lehetővé tette, hogy egy finn kutatócsoporttal együttműködve linkage analízissel keressük a betegség háttérében álló további hibás géneket. Mindkét családban az izombioptátumban COX negatív rostok voltak jelen és a genetikai vizsgálat multiplex mtDNS deléciót talált. A *POLG*, *POLG2*, *PEO1* génekben, egyik családban sem találtunk eltérést. Az amerikai család 12 családtagjának linkage analízise 8. kromoszóma RS874643 és RS1019603 SNPI közötti 16 MB régiójában szignifikáns linkage-t talált (8q22.1-8q23.39). Nem volt linkage viszont adPEO háttérében korábban már igazolt 10q24, 2 4q35, 15q25, 17q23 or 3q28-q29 lókuszekhez. A 8q22.1-8q23.3 pozitív linkage régió 59 ismert és prediktált gént tartalmazott. Ezek közül az *RRM2B*-ről már ismert volt, hogy az mtDNS kópia szám szabályozásban szerepe van, ezért ezt vizsgáltuk először, bár az általunk vizsgált családokban az mtDNS kópia szám normális volt. Az *RRM2B*-nek 9 exonja van, amely 35kb nagyságú régiót fed le a 8-as kromoszómán. A teljes hosszúságú mRNS-e 4,955 bp és az egy 351 aminosav hosszúságú fehérjét, a p53R2-t kódolja. Az *RRM2B* gént szekvenálása során mindkét családban a c.C979T mutáció igazolódott, mely következtében egy arginin helyére korai stop kodon épült be (p.R327X), ami egy kb 25 aminosavval rövidebb fehérje

keletkezését eredményezte. A magyar probandnak a PEO mellett cardiomyopathiája is volt.. A proband testvére súlyos alkoholista volt, mely háttérben depresszió, anxieta is igazolódott. Neurológiai vizsgálata a PEO mellett hypoacusist, renyhe sajátreflexeket, polyneuropathiát, enyhe törzsataxiát és cognitív hanyatlást talált. Édesanyjuk a PEO mellett egyéb tünettel nem rendelkezett. Testvérük malignus hematológiai betegség következtében exitált. Maternális nagybátyjuk, annak lánya és nagynénjük szintén PEO tüneteit mutatja. A magyar proband még 3 adPEO tüneteit mutató családtagjában igazoltuk a mutáció jelenlétét. A 2 család közötti rokonsági kapcsolatot haplotípus analízissel zártuk ki. A patogenitás igazolására 380 európai eredetű kontroll kromoszómát vizsgáltunk meg és ezek közül egyikben sem volt jelen a mutáció. További 5 adPEO tüneteit mutató, multiplex szekunder mtDNS delécióval rendelkező, de még tisztázatlan etiológiájú családban nem találtunk rendellenességet az *RRM2B* génben.

Annak vizsgálatára, hogy a nukleotid készlet érintettsége fokozza-e az mtDNS-ben a mutagenézist egy klinikailag érintett beteg izombiopsziás anyagában meghatároztuk a mutációs load-ot. A szekvenálás során az mtDNS-ben nem találtunk több SNP-t, mint az egészséges korban illesztett kontroll izomban. A 36 éves beteg mtDNS-ben a kontrol régióban 0.96 pontmutáció/10kb-t találtunk, míg a *CYTB* gén régiójában 0.34 mutáció/10kb igazolódott. Így megállapíthattuk, hogy az *RRM2B* gén R327X variánsának (c.C979T mutáció) hatására az mtDNS-ben csak multiplex mtDNS deléciók alakultak ki, a nukleotid készlet érintettsége nem eredményezte az mtDNS pontmutációk frekvenciájának növekedését.

4.1.5.A cereбрalis vérátáramlás és glükóz metabolizmus mitochondriális betegségekben (12. Közlemény, 5., 6. Absztrakt).

A transcranialis Doppler sonographia a 15 mitochondriális beteg és a 17 kontroll egyén MCA átlagsebességeiben nem talált szignifikáns különbséget. A kis arteriolák acetazolamidra adott reaktivitása nem különbözött számottevően a betegek és az egészséges kontrollok között. Mind a betegekben, mind a kontrollokban szignifikáns cereбрalis vérátáramlás fokozódást mértünk. A cerebrovascularis reserve kapacitás nem mutatott szignifikáns különbséget a systoles vérátáramlási sebesség átlagértékében a betegek és a kontrollok között, de a reaktivitás mértéke 15 perc után csökkent a mitochondriális betegekben. A cereбрális glükóz felvétel valamennyi betegben károsodott, akár volt központi idegrendszeri tünetegyüttesük, akár nem. A globális CMR_{Glu} minden betegben a normális szintnél alacsonyabb volt. A CMR_{Glu} (cerebral glucose metabolism rate) csökkenése a temporális régióban és az occipitalis póluson volt a legkifejezettebb.

4.1.6. Új diagnosztikai módszer validálása az mtDNS betegségek prenatalis felismerésére (17. Közlemény, 9. Absztrakt)

A random genetikai drift következtében az mtDNS következtében kialakuló betegségekben szenvedő nőknek nem áll módunkban genetikai tanácsot adni. Ezért különösen fontos, hogy olyan metodika álljon rendelkezésünkre, mellyel segíthetünk ezeknek a betegeknek is a családtervezésben, hiszen a genetikai hiba súlyos klinikai képet is eredményezhet. Kísérleteink során heteroplasmias egér modellen validáltuk a preimplantációs genetikai diagnosztika alkalmazhatóságát mtDNS pontmutáció okozta kórképekben. Az ooplasma és annak polártestjének heteroplasmia arányának meghatározására 6 heteroplasmias egér 29 oocytáját és azok polártestjeit vizsgáltuk meg. Az egyes oocyták heteroplasmia aránya 17.0 és 67.7% között volt. Nyolc oocyta alkalmatlan volt a vizsgálatra. Az előre megszabott kritériumokat 22 oocyta és annak polártestje teljesítette. Az egyes oocyták ooplasmájának és polártestjének a heteroplasmia meghatározásának koeficiense 0.99 volt, míg a gaméta (ooplasma és polártest átlaga) a maternális genotípushoz viszonyítva 0.32. Az egyes blastomerek analíziséhez 15 egér 55 embrióját vizsgáltuk meg. A heteroplasmia arány az egerek farokbiopsziájában 7 és 74% között mozgott, míg az embrióké 3 és 73% között változott. Az egyes embryok egyes blastomerjeinek heteroplasmia aránya gyakorlatilag azonos volt. Az egyes egerek embryoinak a heteroplasmia aránya azonban várákozásainknak megfelelően eltérő volt. A vizsgálatból 2 embryot kellett kizárni, mivel az egyes blastomerek vizsgálata során a duplikátumok nagy szórást mutattak. Az érett oocyták 24%-a nem adott megbízható eredményt. A hiba ráta a blastomerek esetében 1.4% volt. Triplikátum futtatásra az oocytáknál 59.1%-ban került sor. A 203 vizsgálatba bevont blastomer esetében 5 triplikátumot kellett futtatni.

4.1.7. Az mtDNS A3243G és A8344G mutációk epidemiológiai elemzése Magyarországon (32. Közlemény, 27. Absztrakt)

Az mtDNS tRNS^{Leu} gén A3243G mutáció genetikai epidemiológiai vizsgálata

A Pécsi Tudományegyetem (PTE) ÁOK Orvosi Genetikai Intézetével közösen összesen 631 beteg (361 nő és 270 férfi) DNS mintáját analizáltuk. A mintagyűjtés 1999. januártól 2007. december végéig történt. A vizsgálatba Baranya, Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg Megye valamint Budapest ismeretlen etiológiájú fiatalok (45 évnél fiatalabb) ischaemiás stroke, ataxia, maternálisan öröklődő sensorineuralis hallásvesztés, myopathia, és hypotonia miatt vizsgált betegeit vontuk be, amennyiben a klinikai átvizsgálás során felmerült a mitochondriális betegség lehetősége. Valamennyi esetben a molekuláris biológiai vizsgálat diagnosztikai célból történt. A betegek átlagéletkora 36,3 év (nők: 38,1 év, férfiak: 34,4 év) volt. A vizsgált betegek közül 5 nő és 1 férfi betegnél igazolódott az A3243G mutáció. A betegek családtagjainak szűrése során további 8 esetben derült fény az A3243G mutációra. Minden érintett családtagnál a klinikai vizsgálat a mitochondriális betegségekre jellemző tüneteket talált. Egy család esetében a kiskorú gyermekeket tünetmentességükre való tekintettel etikai megfontolások miatt nem vizsgáltuk. Az A3243G mutáció frekvenciája a vizsgált időszakban 2,22 % volt. A betegek klinikai tüneteit az alábbiakban ismertetjük: Egy 33 éves nőbetegnél 12 éves korában kétoldali ptosis jelentkezett, majd 19 éves korában, szülést követően generalizált izomgyengeség és terhelési intolerancia és diabetes mellitus alakult ki. Vizsgálatakor alacsony termetet, kétoldali súlyos ptosist, m. rectus medialis gyengeséget, hypoacusist, myopathiás arcot, nasalis beszédet találtunk. A beteg 15 éves lányát csecsemőkorában enyhe cardiális tünetekkel gondozták, 12 éves kora óta kétoldali ptosis van, egy éve izomgyengeséget panaszolt. Három éves kislánya izmai csecsemőkorában hypotóniások voltak, majd fokozatosan terhelési intoleranciája lett. Most 8 hónapos kislány légzési elégtelenséggel született, átmenetileg gépi lélegeztetésre szorult. Jelenleg mozgásfejlődése lassú. A proband édesanyja cardiomyopathiában szenved, cukorbeteg, nagyot hall és általános izomgyengeséget panaszol. Az A3243G mutáció a proband izmában 45%-os, míg a vérben 35%-os heteroplasmia arányban volt jelen. A gyermekek heteroplasmia arányai: 30%, 60%, és 65%. Egy betegünkönél a mutációt a súlyos klinikai tünetek ellenére csak az izomból izolált DNS-ből 20%-os heteroplasmia arányban tudtuk kimutatni. A beteget születést követően azonnal újraélesztették. Gyermekkorában egyensúlyzavar, szürkületi vakság, gyakori elesés jelentkezett. Vizsgálatakor extrém obesitas, dysmorph arc, micrognathia, diplopia, dysarthria, súlyos ízületi helyérzészavar, tetra végtag ataxia, dysmetria, és akciós tremor volt észlelhető. A proband édesanyja véréből a mutációt nem tudtuk kimutatni. A beteg nővére 20 éves korában ismeretlen eredetű központi idegrendszeri betegségben hunyt el. Egy fiatalkori ischaemiás stroke szindróma miatt vizsgált 35 éves nőbetegnél a mutáció véréből 35%-ban volt kimutatható. Agyi ischaemia mellett súlyos pszichotikus depressziója is volt. A beteget suicidium miatt elvesztettük, így családi szegregációs vizsgálatra nem volt lehetőség. Egy progresszív fehérállomány lesoványodás miatt vizsgált 45 éves beteg esetében a mutáció a vérben 30%-os heteroplasmia arányban volt kimutatható. A beteg astheniás alkatú, kétoldali ptosis, hypoacusis van, izomzata hypotrophiás és hanyatló kognitív funkciókról számol be. Maternális ági rokonai nincsenek, így szegregációs vizsgálatot nem történt. További 2 a PTE-en vizsgált beteg klinikai fenotípusát Komlósi et al. írták le (Orv Hetilap. 2004; 145:1805-1809). Az A3243G mutációt egy MELAS-szindrómára jellegzetes tünetekkel vizsgált 9 éves kislány és egy sensorineurális hallásvesztéssel vizsgált 13 éves fiú esetében mutatták ki. A családi szegregációs vizsgálatokkal további négy esetben igazolták a fenti mutációt.

Az mtDNS tRNS^{Lys} gén A8344G mutáció genetikai epidemiológiai vizsgálata

A tRNS^{Lys} gén A8344G mutáció molekuláris genetikai vizsgálata a PCR-RFLP technikával összesen 513 betegen (302 nő és 211 férfi) történt meg. A beválogatás időtartama 1999 és 2009. július 31. között történt. Valamennyi olyan beteg bekerült a vizsgálatba, akinek a klinikai tünetei, laktát terheléses vizsgálata illetve az izombiopsziája alapján felvetődött a mitochondriális betegség gyanúja. A leggyakoribb klinikai tünetek a következők voltak: myoclonus epilepsia, ismeretlen etiológiájú stroke, progresszív ophthalmoplegia externa, ataxia, myopathia, myalgia, terhelési intolerancia, neuropathia, maternális öröklődésű lipomatosis. Ezek a tünetek gyakran társultak pajzsmirigy betegséggel, hypoacusissal, pszichátriai tünetekkel. A beválogatás Heves, Borsod-Abaúj Zemplén, Szabolcs-Szatmár, Hajdú-Bihar és a közép-magyarországi régiót foglalta magába. A vizsgálat során 11 betegnél (2 nő és 9 férfi) igazolódott az mtDNS mutációja. A szegregációs vizsgálat során, további

2 mutáció hordozóra derült fény, akiknek klinikai tünetei nincsenek. Az egyes betegek klinikai tüneteit a 4.3. Táblázatban soroltuk fel. Az epidemiológiai számítások alapján az adott időszakban a vizsgálatba beválogatott betegek között a mutáció gyakorisága: 2.53 % (Közlés folyamatban).

4.2. Izomdystrophiák

4.2.1.Dystrophin deficienciához társuló szekunder calpain deficiencia(18. Absztrakt)

A 40 éves probandnak (1. beteg) enyhe quadriceps gyengesége és myalgiaja volt 32 éves kora óta. Az EMG myopathiás változásokat talált, a szérum CK aktivitás a normális 15x-e volt. Lánytestvére (2. beteg) aszimptómás, CK értéke 329 U/l. A 2. beteg fia mindig darabos járású volt, 6 éves korában enyhe alsóvégtag gyengeséget észlelt. Tíz éves koráig panaszai nem progrediáltak. CK szintje a normális 20x-a. A mater családjában anyai ágon több fiú korán meghalt izombetegségben. Az 1. és 3. beteg izmának szövettani vizsgálata enyhe dystrophiás elváltozásokat talált néhány necrotikus rosttal, az endomysialis kötőszövet felszaporodásával. A 2. beteg izmában csak igen enyhe rost kaliberingszűkítés tűnt föl. Az 1 és 3. beteg izmának immunocitokémiai vizsgálata a DYS1 és DYS3 antitestekkel a szokottnál halványabb és egyenetlenebb festődést talált az izomrostok felszínén kivéve néhány rostot, amelyek revertant rostoknak tűntek. A DYS2 antitest minden rostban normális reakciót mutatott. A 2. beteg izma mind a 3 dystrophin ellenes antitesttel normális festődésű volt. Extrasynaptikusan néhány nem necrotikus izomrostban az 1. és 3. betegben utrophin expressziót találtunk, míg a 2. beteg csak az endomysialis kapillarisoknál és a véglemezeknél mutatott pozitív szignált. Calpain 3 ellenes antitesttel végzett Western blot analízissel az 1. betegnél a calpain teljes hiánya igazolódott, a 2. és 3. betegnél a calpain mennyisége csökkentnek bizonyult. A primer antitest a teljes nagyságú 94kDa calpain-3 protein és a társuló 30 és 60kDa nagyságú bandeket kimutatja. A polyclonalis dystrophin ellenes antitesttel végzett Western blot a 3 betegben nem talált eltérést a dystrophin nagyságában és mennyiségében. A dysferlin Western blot analízis valamennyi betegben normális szignálokat talált, amelyek kizártuk annak lehetőségét, hogy a protein degradálódott volna. Az 1. beteg calpain mRNS mutáció analízise nem talált mutációt. A dystrophin gén multiplex PCR-al történő analízise a vizsgált régiókban nem talált deléciót. A dystrophin gén SCAIP (single condition amplification/internal primer) szekvenálása a 946. aminosav pozícióban egy 3bp nagyságú deléciót talált (c.2836-2838GAG deléció) a 22. exonban, amely, a Glu kiesését eredményezi a dystrophin molekula 6. spectrin repeatjében. (A vizsgálatot Dr. K. Flanigan végezte University of Utah, Department of Neurology). A calpain cDNS-ének szekvenálása során nem találtunk patogén mutációt az 1. betegben. Feltételezzük, hogy betegeinknél a dystrophinopathia nagy valószínűséggel azért okozott enyhe klinikai tüneteket, mert az egyidejűleg jelenlevő calpain deficiencia bizonyos mértékű védelmet jelentett az izomsejtek számára.

4.2.2.A siketség , mint a dystrophin deficiencia allélikus variánsa (1. Közlemény).

Egy 10 éves kisfiú gyermekotthonból került emelkedett szérum GOT (81 U/l), GPT (250 U/l), LDH (1576 U/l) miatt a SE I. Gyermekklinikára átvizsgálás céljából. Vizsgálatakor súlyos halláskárosodást, a végtagok proximális izomcsoportjaiban enyhe paresist és enyhe vádli hypertrophiát lehetett találni. Hasi UH: kórosat nem talált, a hepatotrop vírusszerológiai vizsgálatai negatívak lettek. Autoimmun panelje normális volt. CK vizsgálata igen magas értéket (6559U/l) talált. EMG vizsgálata során a m. deltoideusban enyhe, a m. tibialis anteriorban közepesen súlyos myogen károsodás igazolódott. ENG normális volt. Cardiomyopathia nem igazolódott. Otoacusticus emissiót regisztrálni nem lehetett, a BAEP a siketisége miatt technikailag értékelhetetlen volt. Közép és belső fül CT-je ép középfület, hallócsont láncolatot, szabályos belső hallójáratot és csigát talált. A siketség hátterében idegi eredetű halláscsökkenést valószínűsítettek. Izombiopsziájában izomdystrophiára jellegzetes képet láttunk, és dystrophin deficiencia igazolódott az izomrostok többségében Ezt a dystrophin Western blot vizsgálat is megerősítette. A genetikai vizsgálat multiplex PCR-al nem talált a dystrophin génben deléciót, de SCAIP (single condition amplification/internal primer) szekvenálás során a dystrophin génben a 68. exont követő intron 3. pozíciójában c.A99743G splice mutáció igazolódott. (Vizsgálta Dr. K. Flanigan, University of Utah, Department of Neurology). A beteg családtagjainak felkutatását követően kiderült, hogy proband 2 testvére és 2 anyai ági unokatestvére is izombetegség miatt állt gondozás alatt. A testvéreket volt alkalmunk vizsgálni, klinikai adataikat a 4.4. Táblázat tartalmazza.

Klinikum	B1 (10 év) -Proband	B2 (7 év)	B3 (6 év)
Hallás	Siket	Normális	Normális
Vádli hypertrophia	Enyhe	Kifejezett	Kifejezett
Izomgyengeség	Enyhe	Közepesen súlyos	Enyhe
Serum CK	6559 U/l	10435U/l	16566 U/l
Izomszövetten	DMD-re jellegzetes	DMD-re jellegzetes	DMD-re jellegzetes
Immunhisztokémia	Dystrophin expresszió nincs	Dystrophin expresszió nincs	Dystrophin expresszió nincs

4.4. Táblázat: A siket dystrophinopathiás kisfiúnak és testvéreinek klinikai adatai

4.2.3. Kihívások a dysferlinopathiák diagnosztikájában (26. Közlemény, 20., 22. Absztrakt)

A 37 éves férfi korai fejlődése zavartalan volt. Először 20 éves korában észlelte lépcsőn járási, futási nehezítettségét. Ekkor már a guggolásból való felállás is gondot jelentett számára. Familiáris anamnézise az izombetegségekre nézve negatív. Neurológiai vizsgálatok medenceöv túlsúlyú, de a vállövet is érintő izomgyengeséget, enyhén myopathiás arcot, fokozott lumbális lordosist, a felső végtagokban közepesen súlyos proximális túlsúlyú izomatropiát és paresist észleltünk. Az alsóvégtagban mind a proximális és distalis izomcsoportok sorvadtak, súlyos fokban gyengültek. A szérum CK 3600 U/l volt. Kardiológiai vizsgálata cardiomyopathiát nem talált. Az izombiopsziában a nagy rostátmérővariabilitás mellett számos nekrotikus rostot, helyenként endomysialis mononukleáris infiltrációkat lehetett detektálni. Elvértve regenerálódó rostok is feltűntek. Elektronmikroszkóppal a nem nekrotikus rostok membránján helyenként folytonossági hiány ábrázolódott, szubsarkolemmálisan vezikula aggregáció, papilláris projekció, bazális lamina kacsok, a kacsokban degenerált globuláris denz anyag volt. Immunhisztokémiai vizsgálattal a dystrophin, a 4 sarcoglycan, a merosin és caveolin expressziója normális volt. A caveolin expresszió néhány izomrostban szokatlan volt. A dysferlin immunhisztokémiai vizsgálata hiányzó sarcolemmális és egyenetlen cytoplasmikus fehérje expressziót mutatott. A dysferlin Western blot során dysferlin hiány mutatkozott. A calpain-3 normálisan expresszáldott az izomszövetben. A dysferlin cDNS-ének RT-PCR-al végzett vizsgálata során a dysferlin génben Arg1768Trp cserét okozó C5302T pontmutáció igazolódott heterozygóta formában. A C5302T mutáció szegregációs vizsgálata során a proband egészséges édesanyjában, nővérében és kislányában is megtaláltuk a patogén mutációt heterozygóta formában. A beteg édesapja nem hordozott mutációt. A családtagok szérum CK-ja normális volt. Az eset jól példázza a genetikai vizsgálat korlátait azokban az esetekben, ahol a patogén mutáció nem a rutin genetikai vizsgálat által rutinszerűen vizsgált kódoló régiókban helyezkedik el.

4.2.4. A glycosylatios rendellenességek szerepe a végtagöv típusú izomdystrophiákban (24. Absztrakt).

A szűrt 53 végtagöv típusú izomdystrophiás beteg közül 6 esetben találtunk hiányzó vagy csökkent immunoreaktivitást az α -DG hyperglycosylált doménjének immunhisztokémiai és Western blot vizsgálata során. Mind a 6 esetben a WGA csökkent kötődését és erős PNA festődést találtunk az izomszövetben. Mind a 6 beteg benignus LGMD szindróma tüneteit mutatta. A *FKRP* genetikai vizsgálata során se a gyakori c.C826A mutáció, sem egyéb patogén mutáció nem igazolódott a kódoló régióban. A vizsgálatok egyértelműen igazolták az α -dystroglycanopathiát, de a háttérben álló genetikai defektusra nem derült egyik esetben sem fény.

4.2.4. A dystrophinopathiák molekuláris terápiája

Elektroporáció (18. Közlemény, 12., 13., 14., 15., 17., 19. Absztrakt)

1. Az feszültség, az egértörzs és életkor hatása a transzfekció effektivitására és a kollaterális károsodásra

A leghatékonyabb EP kombináció a 175 V feszültség, 20 msec impulzus tartam volt a CD1 egerekben. Ez a kombináció csak kevés nekrotikus rostot eredményezett. Az mdx egerekben ugyanez a kombináció kevésbé volt előnyös, a transzfektált rostok száma alacsonyabb, a nekrotikus rostok száma magasabb volt. A feszültség emelésére, a transzfekció effektivitása csökkent, a nekrotikus rostok

száma nőtt. Az idős és fiatal egerek transzfekciós rátájában lényeges különbség volt. Az eredmények statisztikailag szignifikánsan különböztek

2. Az Evans Blue tracerrel történő kollateralis károsodás becslése

Intraperitonealisan (i.p.) adott Evans Blue tracerrel becsültük a kollateralis károsodás mértékét. Az EP-t egy órával megelőzve adtuk az Evans Blue-t, majd EP után egy órával vizsgáltuk annak az izomrostokba jutását. Az izom morfológiai feldolgozása során számos Evans Blue pozitív rostot láttunk. A csaknem egyidőben kivett hematoxylin és eosinnal festett mintában a nekrotikus rostok száma lényegesen kisebb volt, mint az Evans Blue pozitív rostok száma.

3. A hialuronidáz (Hyase) hatása a transzfekcióra

Az EP-Asszisztált Plazmid Mediálta Gén Transfer során a legoptimálisabb EP paraméterek alkalmazása előtt marha Hyase-t injektáltunk a kezelendő izomba. A Hyase szignifikánsan, 15-370 %-al emelte a β -gal-positív rostok számát valamennyi egértörzsben. A növekedés a legkifejezettebb a SCID a legkisebb a CD1 egérben volt.

4. A plazmid méretének hatása a transzfekció effektivitására (az optimális EP paraméterek használata és Hyase adása mellett)

A dystrophin és utrophin expressziót a teljes hosszúságú egér dystrophin vagy utrophin cDNS tartalmú plazmid mdx izomba injektálását követően vizsgáltuk. A cDNS N terminusához egy FLAG epitop kapcsolódott az utrophin esetében, hogy azt az endogen utrophintól megkülönböztesse. Tíz nappal az injekciót követően a FLAG ellenes vagy a dystrophin ellenes antitesttel készült immunhisztokémiai festés, hogy a transzfekció szintjét vizualizáljuk. Az utrophin és dystrophin pozitív rostok száma alacsonyabb volt, mint a pCBLacZ pozitív rostok száma azonos kondíciók mellett. A plazmid koncentráció emelése nem emelte szignifikánsan a dystrophin pozitív rostok számát. Ezen adatok azt igazolják, hogy a nagyobb molekulákkal történő transzfekció kevésbé hatékony.

5. Az izomban a transzgén expresszió és a plazmid DNS partikulák számának változása

Az immunokompetens és immunodeficiens izmokban Hyase adásával kombináltan vizsgáltuk a teljes-hosszúságú dystrophin és pCBLacZ expresszió élettartamát a fentiekben legoptimálisabbnak bizonyult elektroporációs paraméterekkel. A transzfekció szintet a kezelést követő 10, 180, 360. és 460. napon mértük. Az mdx izomban a dystrophin pozitív rostok száma progresszíven csökkent. Mivel a végső időpontban talált dystrophin pozitív rostok száma nem volt magasabb, mint a revertant rostok száma, a kezeletlen mdx egerekben, azt mondhatjuk, hogy 6 hónap után nem volt expresszió. A SCID egérben, az immunválasz hiánya következtében 360 napig nem volt csökkenés a transzfektált rostok számában. Bár a plazmid DNS szint 92%-os csökkenését és a β gal 67 %-os csökkenését láttuk a 10. és 180. nap között, ami azt jelezte, hogy minden rost kevesebb β -galt expresszált. A 180. és 360. napok között nem volt további redukció a plazmid DNS szintet illetően. Ezek az adatok azt igazolják, hogy a plazmid DNS szignifikáns csökkenése ellenére is van még egy év múlva is transzgén expresszió.

Sonoporáció (23., 27. Absztrakt)

A microbubble injekció és az azt követő sonoporáció után az önkéntesek nem észleltek sem korai, sem késői fájdalmat. Az 5 önkéntesből mindössze kettőnél lehetett a jobb karon az injekció helyének megfelelően enyhe bőrreakciót látni. A beavatkozást követően 36 órával a szérum CK nem emelkedett meg. A szintén 36 órával a beavatkozás után a jobb m. biceps brachii-ből vett izombiopsziában valamennyi esetben enyhe sarcolemma károsodást lehetett megfigyelni fénymikroszkóppal és 3 esetben diszkrét endomysialis mononukleáris infiltratio is jelen volt. Már fénymikroszkóppal is lehetett látni valamennyi biopatumban, hogy néhány izomrostban a sarcolemma alatt optikailag üres vacuolák jelentek meg. Az ultrastrukturális vizsgálat a plasma membrán rövid fokális gapjeit, helyenként fragmentációját találta, anélkül, hogy a mélyebb strukturák károsodtak volna. A bo. m. biceps brachii-ban csak minimalis apspecifikus elváltozásokat láttunk. Vizsgálatunk igazolta a fent alkalmazott módszer biztonságosságát és kivitelezhetőségét.

4.3. Herditer perifériás neuropathiák

4.3.1. Új mutációk leírása örökletes neuropathiákban (20. Közlemény, 16. Absztrakt)

A proband (1. beteg) tünetei a lábak, alszárak gyengeségével kezdődtek 41 évesen. Vizsgálatakor pes cavus, peronealis típusú izomatrophia, paresis igazolódott, saját reflexei renyhék voltak, distalis típusú hypaesthesiát jelzett. Lánya (2. beteg) 18 évesen jelzett először fájdalmat alsóvégtagjaiban. Vizsgálata 26 éves korában pes cavust, renyhe sajátreflexeket, distalis típusú hypaesthesiát talált. A proband unokája (5. beteg) hypotoniás csecsemő volt, motoros fejlődése lassult. Két éves korában pedes planit, hyperflexibilis ízületeket, kétoldali peronealis típusú gyengeséget észleltünk. Öt éves koráig nem észleltünk progressziót. A proband idősebb fiának (3. beteg) soha nem volt panasza, 22 évesen enyhe bal oldali peronealis gyengeség észlelhető atrophia nélkül, renyhe sajátreflexekkel érzészavar nélkül. A fiatalabb gyermek (4. beteg) 10 éves korától darabosan fut, pes cavusa van, a láb distalis izmai atrophizáltak, enyhe bilateralis preonealis paresist és az alsóvégtagok sensoros deficitjét észleltük. Az ENG a probandban kifejezett, a 2. betegnél közepesen súlyos, a 3. betegnél enyhe demyelinizációs típusú neuropathiát regisztrált. A 4. betegnél a probandhoz hasonló súlyosságú demyelinizációs típusú neuropathia igazolódott. A legkifejezettebb mértékben csökkent motoros vezetési sebességeket a legfiatalabb beteg (5. beteg) ENG vizsgálata találta. A n. suralis morfológiai vizsgálata során mind a nagy és kis myelinizált axonok denzitása kissé csökkent. Néhány axon myelinhüvelye vékony volt. Az elektronmikroszkópia komplex myelin gyűrődéseket, dekompektált myelin lamellákat és alkalmanként fokálisan begyűrődött myelint detektált. Az *MPZ* gén analízise a 2. exonban T->C tranzíciót (c.T144C) detektált, amely következménye Leu48Pro szubsztitúció lett. A mutáció a protein extracellularis doménjében van. Valamennyi érintett családtagban szegregálódott a mutáció, és 180 egészséges kontroll egyénben azt kimutatni nem tudtuk.

4.3.2. Roma neuropathiák diagnosztikája Magyarországon

Lom típusú neuropathia(15, 24. Közlemény, 11. Absztrakt)

Négy család 8 tagját vizsgáltuk. A klinikai tünetek már az első évtizedben megjelentek. Az első markáns tünet a lassan progrediáló járászavar volt. A kézizmok gyengesége a második évtizedben vált nyilvánvalóvá. A vázizomtünetekkel párhuzamosan különböző ízületi deformitásokat is észleltünk (kéz kisízületeinek elváltozásai, az alsó végtagokon kalapácsujj, pes cavus és equinovarus). A neurológiai képet a motoros tünetek dominálták, de betegeink zöménél mérsékelt fokban distalis típusú felszínes- és mélyérzészavar is kimutatható volt. Két betegünknek hypacusisa is volt. A perifériás idegek érintettsége mellett 2 betegünkönél egyéb neurológiai tünetek is észlelhetők, mint dysphonia, ptosis, fejtremor. Enyhe mentális retardációt betegeink kétharmadánál találtunk. A műszeres diagnosztikai vizsgálatok közül a BAEP 5 betegből négy esetben talált működészavart. Elsősorban a nervus acusticus volt érintett, egy esetben a centralis hallópálya is károsodott. A koponya MR egy esetben volt kóros, enyhe kisagyi atrophiaát jelzett. Az ENG mindegyik betegnél súlyos demyelinizációs motoros és szenzoros polyneuropathiát igazolt. A szenzoros idegek ingerlésekor nem nyertünk válaszpoteenciált, a motoros idegekben súlyos vezetési zavart észleltünk. Két esetben szövettani vizsgálat is történt. A nervus suralisban a myelinhüvellyel rendelkező rostok kifejezett számbeli redukcióját láttuk. Aktív myelinhüvely degenerációra és regenerációra utaló jeleket nem figyeltünk meg, de egy esetben myelintörmeléket is sikerült a Schwann sejtek cytoplasmájában kimutatni. A molekuláris genetikai vizsgálat során valamennyi esetben az *NDRG1* génben (N-myc downstream-regulated gene 1) homozygota R148X pontmutációt lehetett igazolni az *NDRG1* gén direkt szekvenálásával. Az egyik beteg családtagjának szűrése is megtörtént. A beteg édesanyjánál és annak testvérénél is igazolódott heterozygota formában a founder mutáció

CCFDN szindróma (16., 25. Közlemény, 11. Absztrakt).

A roma nagycsaládban apai ágon egy dongalábbal született betegről illetve két szembetegről tudtak. A beteg congenitális cataractával, microcorneával, bal oldali divergens strabismussal született leány. Mozgásfejlődése lassú volt, 6 évesen észlelték először kezeiben a choreiform mozgászavart, 8 éves korában kezdett járni. Menstruációs ciklusa rendszertelen, de a másodlagos nemi jelleg normálisan kifejlődött. Jelenleg 31 éves, termete alacsony (145 cm). Neurológiai státuszából kiemelendő: microcephalia, facialis dysmorphia, mko. cataracta műtét utáni állapot, mko. heves horizontális I. fokú nystagmus, microcornea, súlyos jobbra convex thoracalis scoliosis, hypotrophiás kéz és láb. A csukló flexióban, a kezujjak flektált helyzetben, a lábfejek korrigált pes equinovarus tartásban. A felső végtag proximális izomcsoportjainak ereje megtartott, az alsó végtag proximalis izmainak ereje bal túlsúllyal

közepes fokban csökkent. A végtagok distális izomcsoportjaiban közepesen súlyos paresis. Érzészavart nem jelez. A vállakban és a felső végtag distális részén diszkrét choreiform mozgások. Enyhe törzsataxia. Intellektusa megtartott, jól kooperál. A szérumban CK 300 U/l. Az EEG, a VEP és BAEP nem talált kórosat. Az EMG neurogén izomatropiát, az ENG demyelinizációs túlsúlyú kevert típusú sensomotoros perifériás neuropathiát, az izombiopszia klasszikus neurogén károsodást igazolt. A n. suralisban a vastag velőhüvelyes rostok denzitása kb. 50%-kal csökkent, több axon myelinhüvelye az axon átmérőkhöz képest aránytalanul vékony volt. Regenerációt jelző kis axoncsoportokat, hagymalevélrajzolatot nem detektáltunk. Az ideg elektronmikroszkópos vizsgálata hypomyelinizációt és kistipusú axonelfajulást talált. Aktív myelin szétesést csak a 22 éves korban vett második idegbiopsziás mintában találtunk. Koponya MRI: a bal oldali hátsó occipito-laterális régióban a gyrus rajzolat elsimult, a cortex kissé vaskosabb (polymicrogyria). A sella MRI-n a hypophysis jobb lebenyében microadenoma ábrázolódott. A molekuláris genetikai vizsgálata a *CTDPI* gén homozigóta founder roma mutációját igazolta. A családtagok közül egy apai másod-unokatestvérben is igazolódott a mutáció.

Mitofusin mutáció következtében kialakuló ultrastrukturális elváltozások

A 35 éves nő panaszai 14 éves korban kezdődtek a lábfejek mozgásainak gyengülésével. Neurológiai státuszában jobb oldali strabismus konvergens, a kiskézizmok és az alsóvégtagok hypotrophiája és enyhe paresise emelhető ki. Az alsóvégtagokban a paresis a hátsó kompartmentben a kifejezettebb, lábujjhegyre állni nem tud, sarokra állása nehezített. Saját reflexei renyhék, a végtagokban distális típusú hypaesthesiát jelez. Az ENG szenzoros dominanciájú axonális típusú neuropathiát talált. Molekuláris genetikai vizsgálata a mitofusin génben c.G839A cserét igazolt a 9. exonban, ami R280H aminosav cserét eredményezett. A n. suralis fénymikroszkópos vizsgálata során az axonszám kifejezett redukcióját figyeltük meg, néhány kis regenerálódó axoncsoporttal kísérve. Az ultrastrukturális vizsgálat elsősorban a nagy myelinizált rostok kiesését mutatta, nem volt jelen hagymalevél rajzolat, myelin bomlástermék. A mitochondriumok helyenként megnagyobbodtak, de bennük se paracrystallin inclusiokat, se denz anyagot nem lehetett látni. Helyenként az adaxonális compartmentben kis mitochondriumok felszaporodását lehetett megfigyelni a Schwann sejtekben. Az endoneurális fibroblastokban is helyenként fokális mitochondrium szaporulat tűnt föl.

4.3.4. Primer és szekunder mitochondriális diszfunkció következtében kialakuló perifériás neuropathia

1. Fénymikroszkópos vizsgálatok és n. suralis morfometria mitochondriális betegségekben (4. Közlemény, 1., 2., 3. Absztrakt)

Az általunk vizsgált valamennyi mitochondriális betegségcsoportban (mitochondriális myopathia, Kearns Sayre szindróma, MELAS) a myopathológiai vizsgálat kis csoportokban, ill. elszórtan döntően anguláris, helyenként lekerekített atrophias izomrostokat talált. Az atrophia mindkét rosttípust érintette. Számos rostban subsarcolemmálisan fokozott volt az oxidatív enzimreakció, Gömöri-trichrom festéssel az izomrostok kb. 3-5%-a bizonyult „ragged red” rostnak. A n. suralisban a myelinizált axonok száma átlagosan kb. 20-40%-al csökkent. Némely beteg anyagában Buengner szalagokat és regenerálódó axonokat is láttunk. Elvéve egy-egy vastagon myelinizált atrophias axon is feltűnt. Segmentális demyelinizáció csak ritkán volt látható. A n. suralis morfometriai értékelése során a myelin area és az endoneurális area aránya csökkent a kontroll egyének értékeihez képest. A myelinizált rostok mm²-re vonatkoztatott száma redukálódott, ami egyértelműen bizonyítja a perifériás neuropathiát.

2. Fénymikroszkópos vizsgálatok és n. suralis morfometria inflammatorikus myopathiákban (7., 13. Közlemény)

A gyulladásos myopathiák, különösen az inclusio testes myositis (IBM) vizsgálata során feltűnt, hogy ezekben a kórképekben a mitochondriumok károsodása sokkal gyakoribb, mint egyéb nem mitochondriális betegségekben. A gyulladásos myopathiákban a mononukleáris infiltrációk mind az IBM-ben és a polymyositisben jelen voltak. Valamennyi esetben Gömöri trichrom festéssel a rostok 2-3 %-a bizonyult „ragged red”-nek. Az oxidatív enzimreakció egyenetlen aktivitást talált a rostok többségében. Az IBM esetekben egy kivétellel valamennyi betegnek volt enyhe-közepesen súlyos polyneuropathiája. Az IBM betegek adatait normális n. suralis biopszia morfometriás adataival

hasonlítottuk össze. Ebben az esetben csak enyhe neuropathiát találtunk, melyet számos regenerálódó axoncsoport kompenzált. A molekuláris genetikai vizsgálat során valamennyi vizsgált gyulladásos myopathiában, ahol a morfológiai vizsgálat pathológiás mitochondriumokat talált az mtDNS multiplex deléciója alakult ki.

3. Elektronmikroszkópos vizsgálatok és elektronmikroszkópos morfometria mitochondriális betegekben (4. Közlemény, 1, 2., 3. Absztrakt)

Az izom elektronmikroszkópos vizsgálata során valamennyi mitochondriális myopathiás betegen találtunk patológiás mitochondriumokat. Ezek közül sok tartalmazott paracrystallin vagy osmiophil inclusiokat, esetleg amorph anyagot. A n. suralis axonjaiban soha nem találtunk zárványokat tartalmazó mitochondriumokat, míg ezek a Schwann sejtekben gyakran voltak patológiás szerkezetűek, homogén anyaggal, paracrystallinnal kitöltöttek. A mitochondriumok számának és felületének növekedését észleltük valamennyi vizsgált esetben az izomszövet és a n. suralis kis arterioláinak és capillárisainak a falában levő endothel és perivascularis sejtekben (sima izomsejtek, pericyták). Az emelkedés statisztikailag szignifikáns volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a központi idegrendszer érintettségével és a csak perifériás tünetekkel járó mitochondriopathiák között.

4. Elektronmikroszkópos vizsgálatok és elektronmikroszkópos morfometria inflammatorikus myopathiás betegekben (7. Közlemény)

Az idiopathiás inflammatorikus myopathiás betegek izmában számos subsarcolemmális és intermyofibrilláris mitochondriumot találtunk. Ezeknek vagy az alakjuk, vagy cristázata volt kóros, időnként paracrystallin inclusiok töltötték ki azokat. A kóros mitochondriumok mellett valamennyi IBM esetben patológiás filamentumokat észleltünk. Lokalizációjuk alapján a filamentumok vagy nukleárisak, vagy cytoplasmikusak voltak. Alakjuk és szerkezetük alapján a cytoplasmikus inclusio testek 3 csoportba sorolhatók: (1) klasszikus tubulofilamentosus, (2) fusiform megjelenésű páros helikális szerkezetű, (3) kompakt membránnal határolt tubulofilamentosus inclusiok. A 14 kombinált ideg és izombiopsziás esetből, ahol az izombiopszia igazolta az IBM diagnózist 7 esetben enyhe, 5 esetben közepesen súlyos és 2 esetben súlyos mértékben csökkent a n. suralisban a myelinizált axonok száma. Valamennyi esetben láttunk atrophias és kis regenerálódó axonokat. Myelin bomlásterméket a 14-ből 10 alkalommal észleltünk. A myelinhüvely szokatlanul vékony volt az axon átmérőjéhez képest 11 betegen.

5. NOTCH3 mutációhoz társuló neuropathia és myopathia (19. Közlemény)

A genetikailag igazolt CADASIL-os betegek n. suralis biopsziájának analízise során a perifériás idegek degenerációját és regenerációját jelző eltéréseket találtunk. Az elektronmikroszkópia során helyenként megnagyobbodott túszerű calcium kristályokat tartalmazó mitochondriumok tűntek föl. A vázizomban neurogen atrophira jellegzetes eltérések mellett társuló myopathiát is találtunk, ami ragged red rostokban, kórosan megnagyobbodott mitochondriumokban, fokalisan tubularis aggregatumokban, kórosan megnagyobbodott terminalis cysternákban és myofibrillaris anomáliákban nyilvánult meg. Két esetben az endothelium sejtekben pinocytotikus vacuolák tűntek föl. Egy beteg mt genomját végig szekvenáltuk. A molekuláris genetikai vizsgálata során a következő mutációkat találtuk: T2352C, T6776C, A8860G, T12957C, A15326G. A T12957C báziscsere az MTND5 gén új mutációja, ami nem eredményez aminosav cserét. A többi mtDNS variáció polymorfizmusnak minősült, melyek közül a A8860G, A1438G, A15326G ritka polymorfizmus.

4.3.5. PMP22 duplikációhoz társuló autoimmun betegség. (29. Közlemény)

A proband (1. beteg) tünetei harmincas éve elején kezdődtek a lábak gyengeségével és zsibbadásával. Polyarthritise és immunszerológiai alapján 37 évesen SLE-t diagnosztizáltak, majd másodlagos sicca szindrómája és autoimmun thyreoiditise lett. Neurológiai vizsgálata 44 éves korában pes cavust, a végtagok distalis izomcsoportjaiban atrophiat és súlyos paresist talált, sajátreflexei hiányoztak, súlyos distalis típusú érzészavara volt. A beteg huga (2. beteg) huszas éveiben észlelte végtagjai zsibbadását, ügyetlenségét. Lábaiban neuropathiás fájdalom jelentkezett. Vizsgálata a végtagok distalis izmaiban közepesen súlyos paresist, renyhe sajátreflexeket és enyhe distalis típusú érzészavart talált. Mindkét esetben relative gyors progressziót észleltünk, ezért n. suralis biopszia történt, amely mindkét

betegben vasculitis fennállását igazolta. Az 1. betegnél időközben szisztémás vasculitis is kialakult. Mindkét beteg nagy dózisú methylprednisolont, cyclophosphamidot, IVIg-t kapott és plasmapheresisben is részesült. Az alkalmazott kezelések mellett a klinikai tünetek javulást mutattak. Bátyjuknak (3. beteg) gyermekkor óta darabos volt a járása. Vizsgálatakor 46 évesen az alszáraiban kifejezett hypotrophiát lehetett látni, minkét oldalon pes excavatusa volt, a lábak dorsalflexiója gyengült erővel történt és a végtagokban distalis típusú hypaesthesiát jelzett. Az ő tünetei voltak a legenyhébbek. ENG vizsgálat a nőbetegekben súlyos, a férfi betegben közepesen súlyos demyelinizációs túlsúlyú neuropathiát igazolt. A n. suralis biopszia mindhárom betegben demyelinizációt mutatott, melyhez másodlagos axonális károsodás is társult. A morfológiai kép CMT1A-ra jellegzetes volt. Az 1. és 2. betegben endoneurális lokalizációban mononukleáris sejtek tűntek föl. A gyulladásos sejtek többsége CD8 pozitív volt. Immunszerológiai vizsgálatok az 1. betegnél anti-Smith, cardiolipin IgG és ANA pozitivitást igazoltak homogén ANA festődési mintázattal. Az eredmény SLE-re jellegzetes volt. A 2. betegnek emelkedett anti-SS-A, anti-SS-B anti-ENA autoantitest titere volt. Bátyjuknál nem találtunk autoantitesteket, viszont mindhárom beteg serum IgG szintje csökkent volt és a CD19+ sejteik számát is a normálisnál kisebbnek találtuk. A 2. beteg immunmodulációs kezelése közül az IVIG volt a leghatásosabb, ami jól magyarázható a beteg laboratóriumi leleteivel (22. Közlemény). A CD4+, CD8+ és CD56+ sejtek aránya, a serum IgM, IgA szintje és a complement 3 and 4 koncentrációja normális volt mindhárom betegnek. Mivel mindhárom családtagnál korán jelentkezett a neuropathia és a kis lábizmok atrophiját genetikai vizsgálatot végeztünk a *PMP22* gén deléciójának és duplikációjának kimutatására. A Real-Time PCR-el végzett vizsgálat mindhárom betegnél igazolta a *PMP22* gén duplikációját. Így megállapíthattuk a vizsgált család 2 tagjában a *PMP22* duplikáció autoimmun mechanizmusokkal való coexistenciáját. A 2 etiológia szinergisztikusan súlyosbította a betegek klinikai tüneteit

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A neurológiai és pszichátriai tünetek és a genotípus összefüggéseinek elemzése mitochondriális

A mitochondriális betegségek elsősorban a nagy energiaigényű szerveket érintik, így a központi és a perifériás idegrendszer, valamint a vázizom gyakrabban érintett szervek. PET vizsgálataink igazolták, hogy a glikóóz uptake valamennyi vizsgált mitochondriális betegünk cerebrumában érintett volt, attól függetlenül, hogy a betegnek volt-e KIR károsodásra utaló klinikai tünetegyüttese vagy sem. A legkifejezettebben az occipitalis és a temporalis régiók károsodtak. Felvetődik a kérdés, hogy vajon az érintett régiókban az eltérő cerebrális perfúzióknak vagy az egyes régiók különböző metabolikus rátájának, vagy esetleg mindkettőnek köszönhető az eltérő mértékű oxidatív foszforiláció zavar. A kontroll egyénekben a striatumban volt a legmagasabb a CMR_{Glu} , amit jól magyaráz a régió nagy szinaptikus denzitása. De vajon miért érintett leginkább a temporalis lebeny? Azt tudjuk, hogy a hippocampus stresszre nagyon érzékeny és hogy egyes neurodegeneratív betegségekben, és a bipoláris kórképekben a temporalis neocortexben a deletált mtDNS mennyisége magasabb az azonos korátlagú kontroll csoportnál. A bipoláris betegek hippocampusában az oxidatív foszforilációt és az ATP-dependens proteoszoma degradációt szabályozó enzimek expressziójának kifejezett csökkenését is leírták. A fentiek alapján feltételezhetjük, hogy a mitochondriális diszfunkció befolyásolja a mitochondriumok „calcium-kezelő” képességét és ez a monoaminerg rendszer hyperszenzitivitását eredményezi depressziós tünetegyüttest okozva. A károsodott energia metabolismus stressz-indukálta energia-hiányt, laktát szaporulatot, pH csökkenést okoz az agyban, ami túlstimulálja a monoaminerg rendszert. Ez utóbbi alapján nem meglepő, hogy mitochondriális deficit nem csak depressziókban, hanem schizophreniában is előfordulhat. Ezt igazolja, hogy strukturális és funkcionális rendellenességeket is írtak le schizophren betegek oxidatív foszforilációs rendszerében, valamint, hogy a microarray vizsgálatok a mitochondriális malate shuttle rendszer és a transcarboxylacid ciklus génjeinek érintettségét mutatták. Mi is figyeltünk meg pszichátriai tüneteket mtDNS betegség következtében. A kétpetéjű ikerpár családjában a típusos maternálisan öröklődő A8344G mutáció új fenotípus, affektív betegség formájában jelentkezett, ahol az mtDNS heteroplasmia aránya a pszichátriai tünetek súlyosságával korrelált. Ez a mutáció leginkább MERRF szindrómát okoz, mint ahogy az általunk vizsgált egypetéjű ikerpárban is, de leírták ataxia, myopathia, nagyot hallás, neuropathia és diabetes mellitus háttérben is. Az egypetéjű ikerpárunk anamnézisében is szerepelt

depressziós epizód, de nem az dominálta a klinikai képet. A depresszióról, mint szimptómáról számos mitochondriális betegségben beszámoltak, legyen a betegség mtDNS vagy nDNS mutáció által okozott, de soha nem korrelált a tünet súlyossága a mutáns mtDNS arányával. Az irodalmi adatok szerint az MR spektroszkópia is igazolja bipoláris depresszióban az agyi metabolizmus érintettségét, a nagy energiájú foszfátok csökkent szintjével, a frontális és temporalis lebenyben a csökkent pH-val, és az emelkedett szürke állomány laktát szinttel. Az emelkedett agyi laktát szint a mitochondriális érintettség szenzitív markerének is tekinthető. TCD vizsgálataink eredményei jól korrelálnak azokkal a megfigyelésekkel, hogy az oxidatív metabolizmus károsodása és az anaerob glycolysis relatív fokozódása miatt a mitochondriális betegségekben enyhe agyszöveti lactacidozis alakul ki. A lactacidozis a cerebrális véredények enyhe dilatációját eredményezi. Ez lehet az oka, hogy az acetazolamide teszt csak enyhe, nem szignifikánsan csökkent reserve kapacitás változást detektált a kontroll egyénekhez képest.

A MELAS szindróma patogenezise még mindig rejtély. Korábbi morfológiai tanulmányokban a MELAS-os betegek piális és intracerebrális arterioláiban mitochondriumok felszaporodását írták le. Tokunaga és mtsi (Ann Neurol 1993;45:742-50) feltételezték, hogy a MELAS-os esetekben a véredényekben felszaporodott mutáns mtDNS játszhat fontos szerepet a stroke-szerű tünetek kialakításában. Más szerzők véleménye szerint, a mutáns/normális mtDNS arány fluktuációja okozhat energia krízist a MELAS-os betegek központi idegrendszerében. Így a klinikai tünetek nem a mitochondriális microangiopathia közvetlen következményeként jönnek létre, hanem szisztémás mitochondriális cytopathia okozza azokat. Ez utóbbi véleményt támasztják alá saját morfometriás vizsgálataink, melyek során nemcsak MELAS-ban igazoltuk a vázizomzat kis véredényeiben levő és a n. suralis vasa nervorumában elhelyezkedő mitochondriumok megnagyobbodását és felszaporodását, hanem a központi idegrendszeri tünetekkel csak ritkán járó CPEO-ban és MM-ban is (4. Közlemény, 1 és 2, Absztrakt). E mellett szólnak TCD vizsgálataink is, melyek az acetazolamide teszt alkalmazásakor a cerebrális arteriolák vasoreaktivitásának enyhe csökkenést igazolták valamennyi mitochondriális csoportban (MM, MELAS, KSS/PEO) a kontroll egyénekhez képest. Az acetazolamid teszt eredménye jól korrelál Kodaka et al. (Stroke 1996;27:1350-3) eredményével, akik 13 mitochondriális encephalomyopathiás betegben mérték transcraniális Dopplerrel a cerebrovasculáris CO₂ reaktivitást és annak csökkenését találták. Szintén a mitochondriális cytopathia tényét támasztja alá a szöveti glükóz és oxigén metabolizmus zavarára utaló luxus perfúzió jelensége is, amit egy MELAS-os betegben detektáltak PET segítségével. Feltételezésünket később igazolta Betts et al. (Neuropathol Appl Neurobiol 2006;32:359-373), ui. a MELAS betegekben a corticalis és leptomeningealis véredények falában mitochondriális diszfunkciót jelző kifejezett COX aktivitás csökkenést találtak. Saját eredményeink arra is utalnak, hogy a véredények falában levő mitochondriális cytopathia fontos szerepet játszhat a mitochondriális megbetegedések esetén a perifériás neuropathia kialakításában is. A neuronok perikaryonjaiban talált kóros mitochondriumok pedig azt jelezték, hogy a neuropathia nagy valószínűséggel nem csak a vasa nervorum érintettsége miatt alakul ki.

A mitochondriális betegségek fenotípusa rendkívül változatos. Nem csoda, hogy az 1990-es évek elején leírt klasszikus mutációkkal járó kórképek mai ismereteink szerint csak töredékét teszik ki az mtDNS betegségeknek. Egy klinikai tünetet számos mtDNS mutáció eredményezhet, de egy bizonyos mutáció számos klinikai tünet formájában is megnyilvánulhat. Jól példázza ezt az A3243G és az A8344G mutációk epidemiológiai vizsgálata is. A tünetek intrafamiliarisan is különbözhetnek. Egyik MERRF mutációt hordozó családunk érintett családtagjaiban a heteroplasmia aránya különböző volt és ezzel a pszichátriai és neurológiai tüneteik súlyossága is jól korrelált. A legmagasabb heteroplasmia arányú betegeknél myopathia is jelentkezett, a kisebb mutáns mtDNS arány csak pszichátriai tüneteket okozott. Az egypetűjű MERRF mutációt hordozó ikreknél a heteroplasmia aránya közel azonos volt, neurológiai tüneteik súlyossága azonban már fiatal korukban is eltért. Egyikük súlyos terápiára rosszul reagáló myoclonus epilepsiában szenvedett, melyhez ataxia, és depressziós tünetegyüttes is társult, míg testvére jó terápiás responsivitást mutató myoclonus epilepsiában szenvedett társuló enyhe átmeneti depressziós epizóddal. A monozygóta ikrek eltérő fenotípusa és gyógyszer reaktivitása egyértelműen igazolja az mtDNS mutáció mellett epigenetikai faktorok szerepét is a mitochondriális betegségek klinikai tünetegyüttesének kialakításában.

A disszertációban elemzett patogén mtDNS pontmutációk kivétel nélkül tRNS génekben helyezkednek el. A tRNS mutációk nagy része általában a mitochondriális protein szintézist csökkenti.

Ennek hátterében leginkább a rendellenes aminoacyláció áll. A tRNS-eket az aminoacyl tRNS synthetase nagyon specifikusan ismeri fel, egyetlen báziscsere is "noncharging"-ot okozhat. A kóros aminoacyláció igazolása azonban (különösen, ha ez heteroplasmikus formában történik) bonyolult. Sissler et al. (RNA 2004,;10:841-853) egy olyan in vitro transzkripció modellet hoztak létre, mely segítségével jól követhető az egyes tRNS mutációk következménye. A súlyos mitochondriális myopathiában szenvedő kislányban 4 mutációt detektáltunk a *tRNS^{Leu(UUR)}*-ben. Ezek közül az anticodonban, az 3266. nt-nál levő mutáció a legfontosabb, ui következtében az UAA kód UGA-ra változott. Az UGA triplet normálisan a *tRNS^{Ser(UCN)}*-t kódolja, így az A-G tranzíció következtében a tRNS alapfunkciója változott meg. Homoplasmikus formában ez az étellel összeegyeztethetetlen. A gyermek esetében a mutáció csak az izomszövetben fordult elő csaknem homoplasmikusan, a vérben az nem volt kimutatható. A protein szintézis zavara a kóros aminoacyláció mellett kialakulhatott az anticodon kar destabilizációja miatt (még abban az esetben is, ha a normális aminosav töltődik be, a 3261. és 3259. nt-nál levő pontmutációk az anticodon törzs destabilizációját okozhatják). Ezt igazolja, hogy szintén az anticodon törzsben levő T3271C szubsztitúció súlyos csecsemőkorai myopathiát eredményez, míg a 3260. nukleotid pozícióban levő mutáció felnőttkori cardiomyopathiát/myopathiát hoz létre. Esetünkben a többes mtDNS mutációk együttes hatását valószínűsítjük a klinikai tünetek hátterében.

Hasonlóan több mtDNS variáció szinergisztikus hatásának gondoljuk a dystoniát és fiatalkori stroke-t a közölt 3 tagú családban, ahol a súlyos dystoniában szenvedő fiúban, testvérében és édesanyjában heteroplasmikus új A8332G mutáció igazolódott. A kontroll egyének vizsgálata és az irodalmi adatok ismeretében ez a mutáció patogénnek minősíthető, mert maternális szegregációt mutat, heteroplasmikus formában volt jelen, és a vizsgált 150 egészséges kontroll magyar személynél nem igazolódott. A 8332. nt pozícióban elhelyezkedő „A”, evolúciósan nem erősen konzervált, azonban a mutáció a tRNS 38. nukleotidját érinti, amely mindig a 22. nukleotiddal áll H-kötésben. Ez a kötés viszont már evolúciósan konzerváltnak tekinthető, amely ember esetében a 8316. és a 8332. nt között helyezkedik el. A T8316C szubsztitúció az irodalomból myopathia, laktacidózis és stroke-szerű tünetek hátterében patogénként ismert. Hatására az *tRNS^{Lys}* anticodon törzs első bázispárjai közötti H-kötés oldódik fel. Ennek következtében az anticodon törzs dupla helixe és a tRNS másodlagos struktúrája károsodik. A mutáció hatását a betegek fibroblastjainak csökkent Komplex I. aktivitása is igazolta. Az enzimaktivitás legkifejezettebben az 1. betegben csökkent, akinek a klinikai tünetei a legsúlyosabbak voltak, és akinek a heteroplasmia aránya 65% volt. Ebben a családban az új patogén mutáció mellett 16 további polymorphizmust találtunk az mtDNS-ben. A *COII-tRNS^{Lys}* közötti nem kódoló intergénikus (NC7) régióban egy 9 bp deléciót és a C8270T szubsztitúció is jelen volt. Ezt a deléciót kelet-ázsiai antropológiai markernek gondolták, mely a replikáció során „slipped-stranded mispairing” miatt instabilitást eredményezhet. A C8270T szubsztitúciót eleinte ischaemiás szívbetegségben gyakran előforduló polymorphizmusnak minősítették, majd azt Gonzalez (BMC Genomics 2007; 8:223) és Thangaraj (Hum Hered 2008,; 66:1-9) vizsgálatai a 9-bp-os delécióval együtt az M szubhaplocsoport determinánsának véleményezték. A *tRNS^{Lys}* pseudouridin loopjában (T-loop) talált nt 8347 szubsztitúciót Coon et al. Mitochondrion 2006;6:194-210) MitoChip resequencing array-el Alzheimer-kóros betegekben szignifikánsan magasabb arányban találta meg, mint az egészséges kontroll személyekben. Az általunk talált 3 szinoním (a 9bp deléció, G8697A és az A11812G), és 1 nem szinoním szubsztitúció (T10463C a *tRNS^{Arg}*-ben) maternális öröklődésű sensorineuralis nagyothallásban szenvedő betegekben is előfordult. Ezen kohort egy betegében a T haplocsoport specifikus G8697A szubsztitúció és a T10463C nem szinoním SNP a mi családunkhoz hasonlóan együtt volt jelen. Ez alapján úgy véljük, hogy ezeknek a szekvencia variációknak a szinergisztikus hatása szerepet játszhat a sensorineuralis hallásvesztésben.

Nem csak pontmutációk, hanem az mtDNS egyes és többes deléciói is okozhatnak klinikai tüneteket. A Kearns-Sayre szindrómás betegünk esetében ismertetett, a mitochondriális genom utolsó szakaszára lokalizálódó kis kiterjedésű deléciók relative ritkák. Ez az 1.2 kb terjedelmű deléció a cytochrome b gént és egyet a határoló tRNS-t foglal magába. Feltételezzük, hogy a deléció hatására a Komplex IV. működése nem károsodott szignifikánsan, hiszen cytochrom c jelenlétében a COX reakcióval nem detektáltunk COX negatív izomrostot. A Komplex III. azonban károsodott, mert az extra szubsztrát hozzáadása nélkül a Komplex IV. aktivitás csökkent.

A felnőttkori kezdetű mitochondriális myopathia-neuropathia hátterében általunk leírt egyes nagy mtDNS deléció irodalmi ritkaság. Kizárólagosan perifériás tünetekkel járó mitochondriális betegség

hátterében közlésünk előtt csak mtDNS pontmutációkat írtak le. Az irodalomban elsőként közöltünk olyan mitochondriális myopathiát-neuropathiát, melynek hátterében egyes nagy deléció igazolódott (5. Közlemény). A 8.5 kb-nál nagyobb deléciók csak ritkán fordulnak elő és azokat más klinikai tünetekkel összefüggésben írták le. Ballinger et al. (Nat Genet 1992,; 1:11-15) maternálisan öröklődő diabetes mellitusban találtak heteroplasmikus 10.4 kb nagyságú deléciót, amely a nehéz lánc replikációjának kiindulási helyét is érintette. Mi esetünkben nem károsodott a replikáció origója és a transzkripció promoter régiója, a deléció 9 polypeptid gént és 9 tRNS gént érintett. Mint KSS szindrómás betegünknel már említettük, ez a tRNS domináns szerepet játszik a különböző mitochondriális betegségek patogenezisében. A tény, hogy relative nagy génszakasz deletált, de a klinikai tünetek mégis enyhék, azzal magyarázható, hogy a deletált genomok száma alacsony volt. Megfigyeléseink alapján a tünetek súlyosságát nem a deléció lokalizációja és mérete határozza meg, hanem a heteroplasmia mértéke. Ezt a feltételezést támasztja alá Shoffner et al. adatai is (1995, Neurology; 45:286-292), miszerint a *tRNS^{Leu(UR)}* génben egyetlen nukleotid pár deléciója is okozhat mitochondriális encephalomyopathiát.

5.2.A mitochondriális *tRNS^{Lys}* gén és határoló régióiban talált eltérések jelentősége

Az mtDNS egyes szakaszain a mutációk előfordulásának gyakorisága különböző. A tRNS gének mutációs rátája rendkívül magas, így ezek a mitokondriális genomon belül hot spot régióknak tekinthetők (www.mitomap.org). A legtöbb mutációt a *tRNS^{Leu(UR)}* génben találták. Második helyen áll a *tRNS^{Lys}* gén, amelynek eddig 14 különböző patogén mutációját és 8 polymorphizmusát írták le (www.mitomap.org). Munkánk során a mitochondriális *tRNS^{Lys}* gén és annak közvetlen közelében levő gén szakaszok variabilitását és a variabilitás következtében keletkező szubsztitúciók következményét tanulmányoztuk mitochondriális betegség gyanúja miatt vizsgált és egészséges kontroll egyénekben. Vizsgálataink során a kérdéses régióban 10 különböző mtDNS variációt találtunk. A cytochrom oxidáz-c II. alegysége, és *tRNS^{Lys}* gén közötti szakasz az irodalomból is hypervariábilis régióként ismert. Ebben a régióban három magyar családnál az nt 8271-8280 között egy 9 bp-os deléciót találtunk, amelyet kelet-ázsiai antropológiai markerként tartottak nyilván. Kaukázusi populációban ez az eltérés rendkívül ritka, eddig három esetben írták le Skóciában, Spanyolországban és Finnországban. Ezzel szemben a 9 bp deléció előfordulási gyakorisága Kínában 14,7%; Taiwanban 21%; Thaiföldön 18-45%; Indiában 2,15%; Afrikában 0,9% míg a venezuelai indián populációban 3,39%. Az amerikai indiánok között is relative gyakran találják meg. A hypervariábilis génszakasz deléciója a korábbiakban diszkutált módon feltehetően a „slipped-stranded mispairing” mechanizmussal instabilitást okoz és így további mtDNS hibák kialakítására hajlamosíthat. Ezt igazolja a megfigyelés, hogy Taiwanban az A8344G patogén szubsztitúcióval bíró betegek 67%-ában találták meg ezt a deléciót, míg az egészséges népességnek mindössze 21%-ában volt jelen. Az 5.1 pontban diszkutált dystoniás magyar család esete is igazolja ezt a feltételezést, hiszen mtDNS-ükben a kérdéses régióban a 9 bp deléció mellett a 8270. és 8347. nukleotid SNP-je és a A8332G patogén mutációja igazolódott. A 9 bp deléció jelenléte miatt a család mtDNS-t haplotipizáltuk (Dr. Raskó István) és ősi, ázsiai populációra jellemző B haplocsoportot találtuk. A honfoglaló magyarok csontjainak haplotípus elemzése azonban 70-ből csak 1 esetben találta meg a fenti haplotípust, amely alapján nem valószínű, hogy az általunk vizsgált magyar család közvetlen rokonsági kapcsolatban áll a honfoglaló magyarokkal. Úgy gondoljuk, hogy a kelet-ázsiai antropológiai marker (9 bp deléció) jelenléte a magyar betegekben származhat a magyarság történelméből, de nem zárható ki azonos lokalizációjú rekurrens deléció megjelenése sem. A másik két 9 bp delécióval rendelkező családuknak nem ősi haplocsoportba tartozik. A Taiwanban talált korrelációk és az általunk vizsgált esetek alapján feltételezzük, hogy a 9-bp-os deléció jelenléte az mtDNS hypervariábilis szegmensében a mitochondriális genom instabilitását eredményezi és hajlamosíthat patogén mutációk kialakulására is. Az ismert A8344G MERRF mutációt 13 esetben találtuk meg a betegekben. A betegek klinikai tünetei rendkívül változatosak voltak és a várt klasszikus tünet csak az esetek 20%-ban volt jelen. Egy típusos MERRF szindrómás család esetében ehhez mutációhoz aA8347C és a G8251A polymorphizmusok is társultak. Tüneteik súlyosságát nem befolyásolta társuló SNP-k jelenléte. A fenti eltéréseken kívül a vizsgált régióban további öt polymorphizmust (G8251A, G8269A, C8270T, del. 8271-8280, G8292A) találtunk, amelyek mindegyike antropológiai markernek minősült.

5.3. Az mtDNS A3243G A8344G mutációinak genetikai epidemiológiai vizsgálata

A neurológiai betegségek háttérében az mtDNS A3243G és A8344G mutációjának előfordulási gyakoriságát közép-kelet Európában munkacsoportunk vizsgálta elsőként. Az A3243G mutációt 631 valószínűleg mitochondriális betegségben szenvedő beteg közül 14 esetben (6 beteg és 8 családtag) tudtuk kimutatni, mely alapján a kohortban az előfordulás frekvenciája 2,22%. Az A8344G mutáció 513 betegből 11 alkalommal és 2 családtagban igazolódott, így ennek a mutációnak a frekvenciája a vizsgált kohortban 2,53%. A mitochondriális betegségek össz prevalenciáját egy spanyol tanulmány a 14 év feletti populációban relative magasnak találta (5,7:100.000), ahol a diagnózist a klinikai tünetek mellett a morfológiai és molekuláris biológiai vizsgálati eredmények alapján állították fel. Az A3243G mutáció több közlemény szerint is az mtDNS betegségek közül a leggyakoribb előfordulású. Pang et al. (J Formos Med Assoc 1999; 98:326-334) vizsgálatai is ezt a feltételezést támasztják alá, ugyanis 177 mitochondriális betegből 32-nél találták meg ezt a mutációt és 9 esetben A8344G szubsztitúció igazolódott. Chinnery et al. (Lancet 2004,; 364:592-596) a patogén mitochondriális mutációk jelenlétét 1:8.000-re becsülte. A mitochondriális etiológiát (A3243G mtDNS mutációt) a fiatakkori stroke szindrómákban Majamaa et al. 38 occipitalis területen lezajlott ischaemiás stroke-os 71 betegnél összesen 2 esetben, az esetek 5,26%-ban talált (Am J Hum Genet 1998;63:447-454). Az A3243G mutáció frekvenciája különböző országokban nagy variációt mutat, amely függ a beválasztás kritériumától. A legtöbb tanulmány a mutáció előfordulását diabetes mellitus-os betegekben vizsgálta. Az irodalomból hat olyan tanulmány ismert, ahol az A3243G mutáció gyakoriságát multiszisztémás tünetekkel bíró mitochondriális fenotípusok háttérében vizsgálták, és a beválasztási kritériumoknál figyelembe vették a morfológiai eredményeket. A mutáció frekvenciája ezekben az esetekben 0% és 44,33% között volt. Ezek közül 3 tanulmányban a betegeket az izombiopszia eredménye alapján előszűrték és csak azon betegeknél történt genetikai vizsgálat, akiknél az izombiopszia mitochondriális betegségre utalt. Ezekben az esetekben a mutációs frekvencia 12,5% és 44,33% között volt. Vizsgálatunkhoz hasonló beválasztási kritériumot 3 munkacsoport alkalmazott. Az eredményeket összehasonlítva a finn népesség körében az A3243G mutáció előfordulása lényegesen nagyobb (6,5%) míg Franciaországban (1,2%) és Taiwanban (3,39%) a magyar népesség körében talált mutációs frekvencia értékekhez (2,22%) hasonló eredményt kaptak.

Gondolkodásunkban mind a MELAS szindróma, mind az annak háttérében álló leggyakoribb mtDNS mutáció, az A3243G szubsztitúció is, leginkább a fiatakkori stroke-kal kapcsolódik össze és a maternális öröklődésű egyéb mitochondriális betegségekre utaló tünetek, mint nagyothallás, ataxia, alacsony termet, endokrin zavarok, basalis ganglion meszesedés, diabetes mellitus már nem asszociálódnak az mtDNS ezen nukleotidjának mutációjával. A finn adatokhoz képest az általunk vizsgált időszakban az A3243G mutáció előfordulása alacsonynak bizonyult. Nem zárható ki, hogy a finn népességben ténylegesen nagyobb a valószínűsége az mtDNS A3243G mutáció előfordulási gyakoriságának, de az egyéb európai molekuláris epidemiológiai vizsgálatok alapján ennek valószínűsége kicsi. Az A3243G mutáció frekvenciája nagymértékben függ a betegek szelekciójától.

Az A8344G mutáció gyakoriságát eddig 6 országban vizsgálták, Finnországban 621 olyan beteget választottak be, akiknek klinikai tünete mitochondriális betegségre utalt. Meglepő módon egyetlen pozitív beteget sem találtak. Ezek szemben Texasban 2%, Észak-Kelet-Angliában 3,85%, Koreában 4,62% és Taiwanon 5% volt a mutációs frekvencia a kiválasztott betegekben. Csaknem minden munkacsoport a mitochondriális betegség gyanús teljes kohortot vizsgálta változó szigorúságú kritériumok mellett. Ha a kritérium nagyon szigorú volt, azaz csak a bizonyítottan OXPHOS betegek kerültek be a vizsgálatba a mutációs frekvencia megemelkedett 23%-ra. Az mtDNS epidemiológiai vizsgálatokban nem csak a betegbeválasztási kritérium jó megválasztása, hanem a heteroplasmia miatt a vizsgált szövetek és a metodika is befolyásolják az eredményt. Horvátországban közöltek egy tanulmányt, melyben az A3243G mutáció csak a buccalis nyálkahártyából izolált mtDNS mintából volt kimutatható, míg a vérből izolált DNS minta elemzése nem érzékelte annak jelenlétét. A mi betegeink között is volt egy, akinek csak izomszövetében tudtuk detektálni A3243G szubsztitúciót, a vérben az nem volt kimutatható. Ez a tény felveti annak lehetőségét, hogy a vérben levő igen alacsony szintű heteroplasmia arány miatt nem kerül a pontmutáció felismerésre. Ennek alapján a mutáció legbiztosabban posztmitotikus szövetből mutatható ki. A szájnálkahártya sejtei nem posztmitotikus sejtek, de ezek turnovere kisebb, mint a perifériás vér elemeinek turnovere, ami meggátolja a mutáció un. kimosódását, így posztmitotikus szövet hiányában ez is alkalmas lehet a mutáció analízisre. A két epidemiológiai tanulmány alapján elmondhatjuk, hogy az mtDNS pontmutációk epidemiológiai vizsgálatainak eredménye, a kapott frekvencia érték nagymértékben függ a vizsgált betegektől.

beválasztási kritériumától és a vizsgált szövettől. Az általunk kapott mutációs frekvenciák hasonlóak más európai országok közölt adataival.

5. 4. A molekuláris biológiai vizsgálatok szerepe az mtDNS betegségek diagnosztikájában és prenatális diagnosztikájában

A genetikai betegségben szenvedő pároknak sok esetben lehetőségük van prenatális diagnosztikára és a foetus érintettsége esetén a terhesség terminációjára. Több mint 40 monogén betegségben ma már alternatív diagnosztikus lehetőség a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD). A mendeli betegségektől eltérően, ahol a cél a mutáció jelenlétének vagy hiányának a megállapítása az embrióban, a mitochondriális betegségekben a mutáns mtDNS heteroplasmia arányának meghatározása a cél. Így mielőtt az mtDNS betegségekben ajánlanánk a PGD-t fontos a mutáns mtDNS szegregációs mintázatának megértése a női ivarsejtekben. A heteroplasmikus mtDNS transzmisszió vizsgálatára két neutrális mtDNS polymorphizmust tartalmazó egértörzset használtunk. Ebben az egértörzsben az mtDNS polymorphizmus utódokba való transzmisszióját a random genetikai drift határozza meg, hasonlóan a human mtDNS betegségekhez. A PGD az oocyta vagy a zigota polár testjéből, vagy a korai embrió egyes blastomerjéből is kivitelezhető. A polártest vizsgálata etikai szempontok miatt előnyösebb lehet, hiszen elkerüli a human embrióval való manipulációt. Vizsgálataink alapján az első polártest és az érett oocyta ooplasmájának heteroplasmia (HP) aránya gyakorlatilag identikus. Ez azt bizonyítja, hogy még a polár testben jelen levő kis mennyiségű mtDNS és jól reprezentálja a teljes oocytát. Az ugyanazon egér egyes oocytáinak HP aránya azonban nagyon különböző volt, és eltért az anyai HP aránytól is, feltehetően az mtDNS genetikai „üvegnyak hatás” elvén kialakuló transzmissziójának köszönhetően. A korai embriók egyes blastomerjeinek HP aránya csaknem azonos volt. A 2, 4, 6 és 8 sejtes embriók egyes blastomerjeinek mtDNS tartalma nagyon különböző, de ez nem befolyásolta a diagnosztikus vizsgálat kivitelezhetőségét. Annak ellenére, hogy Van Blerkom et al (Hum Reprod 2000; 15:2621-2633) a human embrió pronukleáris állapotában aszimmetrikus mitochondriális megoszlást figyelt meg, vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy az egyes blastomerekben jelen levő össz mitochondrium szám nem befolyásolja az egyes sejtekben a különböző genotípusok arányát. Megfigyeléseink szerint mind a kis mtDNS tartalmú polár test és a nagyobb mtDNS tartalmú blastomerek vizsgálata alkalmas a PGD-ra, de a blastomer biopszia nagyobb biztonsággal alkalmazható. A polár test vizsgálatakor ui. a hiba ráta 21% volt, míg a blastomerek esetében az csak 2%-t tett ki. A polár test mtDNS gyengébb amplifikációját okozhatta a kisebb cytoplasma és következményesen alacsonyabb mtDNS mennyiség, de nem zárható ki az sem, hogy a polár test mtDNS molekulái degradálódtak. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy mind az egér és a human embriók első polár testjeiben az in vitro incubatio során gyors degeneráció figyelhető meg. A prediktív PGD adatok interpretációja során hasonló elveket követhetünk, mint a mitochondriális betegségek prenatális diagnosztikája során, azaz $\leq 30\%$ alacsony mutáns tartalomnak (loadnak), $> 80 - 90\%$ nagy mutáns loadnak minősül, míg a közti „szürke zóna” értelmezése nagyon nehéz. Az intermedier HP arány mellett nem zárható ki, hogy a foetus érintett lesz és ez már a terhesség terminációját indikálná. A rendelkezésünkre álló adatok alapján ma azt javasoljuk, hogy a 0% vagy alacsony mutáns HP tartalmú embriók alkalmasak az embrió transzferre, az intermedier vagy nagy mutáns load-ú embriók transzfere elkerülendő. Nem szabad figyelmen kívül hagyni Poulton és Morten megfigyelését sem (Ann Neurol 1993; 34:116), miszerint még az embrió alacsony HP aránya sem zárja ki azt, hogy a későbbiekben egyes mtDNS mutációk esetén szignifikáns szövet-specifikus segregatio alakulhat ki az egyedben. Természetesen ezek csak irányelvek, minden egyes PGD egyéni megítélést igényel. Kísérleteink validitását Stefann et al. (J Med Genet 2006; 43:244–247) human PGD vizsgálatai igazolták, ui. ők alkalmazták először a PGD-t human mitochondriális betegségben az mtDNS T8993G kimutatására. Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy mtDNS betegségekben a PGD megfelelő technikai felkészültség mellett biztonsággal kivitelezhető módszer. A vizsgálathoz a 8 sejtes embrió blastomer biopsziáját javasoljuk, és két blastomerből a molekuláris biológiai teszt parallel elvégzését. Az 1. polar test HP aránya ugyan egyezik az ooplasma HP arányával, de alacsony DNS koncentrációja, esetleges degradációja miatt nagy a hiba lehetőség, így annak vizsgálata a rutin diagnosztika számára nem optimális.

5.5. A nukleáris *RRM2B* gén heterozigóta mutációja, mint az az autosomalis dominans ophthalmoplegia externa új etiológiája

A DNS replikációjához és repairjéhez a dNTP-vel való optimális ellátás elengedhetetlen. A sejtek dNTP-je a ribonukleozid-difoszfátok de novo deoxyribonukleozid-difoszfáttá redukálódása következtében keletkezik. Ezt a feladatot a cytoplasmikus ribonukleotid reduktáz enzim (RNR) látja el, amely R1 és R2 alegységekből áll. A postmitotikus sejtekben dNTP-re a DNS repair és mtDNS replikáció során van szükség, melyet az R1 és p53R2 alegységek komplexe szolgáltat. A p53R2-t eredetileg a nukleáris DNS károsodására adott válaszból, illetve a tumor szuppresszióban gondolták aktívnak. Időközben a DNS repairben való szerepe megkérdőjeleződött. Azt viszont biztos, hogy a differenciált sejtekben fontos szerepe van az mtDNS-ek fenntartásában. Ezt támasztja alá az a tény, hogy az *RRM2B* homozigóta „loss-of-function” mutációja súlyos mtDNS depléciós szindrómát (MDS) okoz. Az *RRM2B* knockout egér általános gyengeség miatt életképtelen, mtDNS kópia száma lényegesen csökkent. Az általunk vizsgált adPEO betegek izomszövetének mtDNS kópia száma real time PCR-el vizsgálva kontroll egyénekéhez hasonló volt, viszont az izomszövetből izolált DNS-ben multiplex deleciót találtunk. Némely MDS-t okozó *RRM2B* mutáció csonkolt proteint eredményez hasonlóan az általunk talált R327X mutációhoz. Ezekben az esetekben azt gondoljuk, hogy a heterozigóta hordozóknak hasonló tünetek lehetnek, mint a mi betegeinknek. Más mutáció, mint pl. a homozigóta Q284X mutáció feltehetően nonsense-mediated decayt eredményez, mert a Western analízis nem talált protein terméket ezekben az MDS-es csecsemőkben. Az ilyen mutációknál az *RRM2B*, haploinsufficiencia nem minősül patológiásnak, mert a heterozigóta carrierok, az MDS betegek szülei egészségesek. Az általunk vizsgált betegekben csonkolt p53R2 protein (ha a C-terminalis 24 aminosava hiányzik) keletkezett, amelynek köszönhetően a p53R2 homodimer és a R1 homodimer interakciója valószínűleg károsodik, mert a hiányzó heptapeptid ehhez az interakcióhoz szükséges. A mutáns protein gain-of-function vagy domináns negatív hatása okozza az RNR funkció változását és a postmitotikus szövetekben a dNTP háztartás felborulását. A nukleotid pool változásai a mutagenezist fokozhatják. Jelen esetben a 36 éves férfi izmában az mtDNS-ben 0.96 mutáció/10kb mutáció volt a kontrol régióban és 0.34 mutáció/10kb a cyt b gene régióban. Az irodalmi adatok alapján hasonló mutációs load található egészséges egyének izomszövetében is (0.2-2 mutáció/10kb a kontrol régióban és 0.2-1 mutáció/10kb a cyt b gén régióban). Így elmondhatjuk, hogy a p53R2 R327X variánsa nem mtDNS pont mutációkat, hanem multiplex mtDNS deleciót eredményez. Hasonló multiplex mtDNS deleciókat írtak le a szintén dNTP pool zavart okozó ANT1 mutáció következtében is. Az *RRM2B* gén nonsense mutációját munkacsoportunk elsőként írta le az adPEO háttérében. Vizsgálataink igazolták, hogy a p53R2 hibája olyan felnőttkori kezdetű izombetegséget is tud okozni, amely a mitochondriális homeostatis zavarát eredményezi, de onkológiai vonatkozásai nincsenek. Eredményünk következtében kibővült az adPEO háttérében álló gének sora, azonban p53R2 domináns negatív vagy „gain-of-function” hatás következtében kialakuló multiplex mtDNS deleció kialakulásának pontos mechanizmusa még várat magára.

5.6. Izomdystrophiák és hereditár neuropathiák molekuláris diagnosztikai stratégiája

5.6.1. A szekunder calpain deficiencia jelentősége az izomdystrophiák diagnosztikája során

Az LGMD diagnosztikai lehetőségeinek fejlődése a genetikai hiba felismerésén túl további, a betegség patogenezise és terápiája szempontjából fontos információkat is nyújthat. Ilyen fontos megfigyelés az irodalomban elsőként leírt különleges dystrophinopathiás családunk, ahol szekunder calpain deficiencia társult az alapbetegséghez. Tudomásunk szerint ez a család az egyetlen olyan család, ahol az enyhe X kromoszómáisan öröklődő izomdystrophia háttérében dystrophin deficiencia és szekunder calpain deficiencia sajátos kombinációja igazolódott. A szokatlanul enyhe fenotípus felveti a kérdést, hogy vajon a kombinált dystrophin és calpain deficiencia egymás negatív hatását enyhítik-e? A családi anamnézis alapján 2-3 generációval korábban nem csak enyhe tünetek voltak, ami azt jelezi, hogy önmagában ez a dystrophin mutáció nem ártalmatlan. A DMD adatbázisban csak egy beteg található, ahol a mi betegünkénél is érintett régióban volt bázispár csere (www.dmd.nl). Ennél a betegnél a c.G2836T csere a dystrophin gén 22. exonjában a Glu kodon helyett Stop kodont eredményezett, így a súlyos fenotípust okozó mutáció természeténél fogva nem hasonlítható a mi eseteinkhez. Azt feltételezzük, hogy az ismeretlen etiológiájú nagy valószínűséggel szekunder calpain deficiencia dystrophin expressziót fokozó hatása enyhítette a klinikai tünetek súlyosságát. A calpain inhibícióval történő dystrophin expresszió fokozására ugyanis az irodalomban található adatok. Természetesen nem zárható ki az sem, hogy a 22. exon c.2836-2838 GAG deleciója következtében kieső Glu hiány a dystrophin funkciója szempontjából nem jelentős változást eredményez és így ennek köszönhető a

családban leírt enyhe fenotípus. Mindenesetre az igen magas szérum CK szintek és az izombiopsziában látott izomdystrophiás elváltozások alapján korábbi tapasztalataink Becker fenotípust prediktálnának és az észlelt klinikai tünetek ennél is sokkal enyhébbek.

5.6.2. A nem kódoló DNS jelentősége az izomdystrophiák patogenezisében

Időnként a klasszikusnak számító LGMD szindrómák genetikai vizsgálata is hozhat meglepetést. Ilyen a dysferlinopathiás betegünk esete, ahol a Western blot alapján vetődött föl a dysferlin deficiencia gyanúja. A genetikai vizsgálat meg is találta a cDNS szekvenálása során az egyik allélen a C5302T patogén mutációt, ami az Arg1768Trp aminosav cserét eredményezett egy evolúciósan erősen konzervált helyen. A másik allél cDNS-e normálisnak bizonyult. A patogén mutációt korábban Myoshi myopathiában írták le, ami az LGMD2B allélikus variánsa, szintén AR öröklődésű. A mutáció autoszomális domináns negatív hatásról eddig irodalmi adatot nem találtunk. Saját eredményeink is ez ellen szólnak, mert 3 egészséges családtag is hordozta a mutációt. Mivel a talált dysferlin gén mutáció a korábbi közlések és sajátosságai alapján is egyértelműen patogénnek minősül betegünk az egyik allélen azonosított mutációval és az izombiopsziában levő dysferlin hiánnyal compound heterozygótának minősíthető. A másik allél mutációja nagy valószínűséggel a dysferlin gén nem kódoló régiójában, vagy az intronokban, vagy a 3' vagy 5' szabályozó régióban vagy a transzkripció terminátor régióban van. Ezen régiók vizsgálata nagyon nehézkes és a rutin diagnosztika számára nem érhető el. A core dysferlin promoter fragment szekvenálása 14 feltételezetten dysferlinopathiás betegben, akikben a szokásos mutáció keresés nem hozott eredményt, nem talált patogén mutációt, arra utalván, hogy ez a típusú hiba nem lehet gyakori a betegség hátterében. A teljes irodalom áttekintése során 45 olyan beteget találtunk, akikben csökkent vagy hiányzott a dysferlin protein a vázizomban és csak 1 heterozygóta patogén mutációt sikerült azonosítani (www.dmd.nl). Ezt a jelenleg rendelkezésünkre álló molekuláris technikák korlátai magyarázhatják, de nem zárható ki a nem kódoló ("junk") DNS-ben levő elváltozások patogenitása sem. A "junk" DNS a human szekvencia 98.7%-a. Ismereteink szerint eddig összesen 6 introni DYSF mutáció patogenitása igazolódott a dysferlinopathia hátterében. Úgy gondoljuk a nem-kódoló DNS szerepének további vizsgálatára új diagnosztikai technológiák kidolgozása szükséges. Jelenleg a klasszikus myopathológiai és Western blot vizsgálatok nélkülözhetetlenek az LGMD ezen típusának diagnosztikájában. Esetenként a rutin molekuláris genetikai vizsgálat nem tudja kizárni az egyes gének patogénitási szerepét, azaz nem minden esetben elegendő az egyes betegségek diagnózisának felállításához. A fentiek alapján diagnosztikus stratégiaként azt javasoljuk, hogy minden esetben a klasszikus módszer követendő az LGMD okának kiderítésénél, azaz az izombiopszia immunhisztokémiai feldolgozását követő Western blot, és annak eredménye ismeretében végzendő el a kóros protein génjének analízise. A dysferlin gén kódoló szekvenciája mellett az 5' és 3' nem transzlálódó régió is meghatározása, valamint a junk DNS SNP analízise hozhat az izomdystrophiák diagnosztikájában új távlatokat megnyitó lehetőséget.

A dystrophin génben is vannak patogén introni mutációk. Ilyet közlünk mi is a süket dystrophinopathiás kisfiú és családja esetével, ahol a dystrophin gén 68-as exonját követő intron 3. pozíciójában találtunk splicing variánst. A család esete tette lehetővé, hogy először igazoljuk genetikailag, hogy a nem-szindrómás DFN4 típusú süketiséget okozó genetikai hiba (melyet korábban leírt 2 nagycsalád linkage analízise kapcsán az Xp21.2 lókuszra lokalizáltak) ténylegesen a dystrophin génbe lokalizálható. A korábbi megfigyelések csak indirekte bizonyították, hogy a DFN4 kapcsolt non-szindrómás süketiség ténylegesen a dystrophin funkciózavar következtében alakul ki. Az állatkísérletek eredményei ellentmondóak, egy közlemény van, amely egyértelműen bizonyítja, hogy a dystrophin hiányos egerekben a zaj nagyobb mértékű halláskárosodást okoz, mint az egészséges állatokban. A halláskárosodást ezekben az mdx egerekben nemcsak a n. acusticus, hanem az agytörzs károsodása is okozhatta. Családunkban a dystrophin gén egyik intronjának splicing mutációja következtében alakultak ki a klinikai tünetek. Ugyanez a mutáció a 3 testvérből kettőben jellegzetes Duchenne típusú izomdystrophia klinikai képét eredményezte, míg a 3. gyermekben a süketiség volt a vezető tünet. A süketiség és az izomdystrophia jelen esetben allélikus variánsnak minősíthetők. A kérdés újból felveti a már dysferlin hiányos családnál is tárgyaltakat, azaz a „junk DNS” szakaszok szerepének fontosságát a klinikai diagnosztikában. Az új molekuláris genetikai metodikáktól, mint az új típusú szekvenátorok és a jövőben a rutin diagnosztikában is alkalmazható chip technológiáktól reméljük ezeknek a nyitott kérdéseknek a megoldását.

5.6.3. Glycosylatio szerepe a végtagöv típusú izomdystrophiákban

Vizsgálataink során azt találtuk, a LGMD betegek szignifikáns százalékában (11.3%) okozza az α -DG hypoglycosylatio következtében kialakuló molekuláris patológia a betegek tüneteit. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy a hyperglycosylált α -DG immunhisztokémiai és Western blottal való kimutatása elengedhetetlen nem csak a congenitális izomdystrophiák, de az LGMD átvizsgálása során is. Az α -DG hypoglycosylatio az α -DG posttranszlációs módosításában szerepet játszó glycosyltranszferázok hibás működése következtében alakul ki. Napjainkban az α -dystroglycanopathiák jelentős számában a végleges genetikai diagnosis a rutinszerűen alkalmazott módszerekkel nem születik meg, mint ahogy azt mi is tapasztaltuk az általunk vizsgált szériában. Ennek az egyik lehetséges oka a glycosylatioért felelős gének nagy száma. Mostanáig a *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, fukutin, *FKRP*, és *LARGE* génekről bizonyosodott be, hogy mutációik izombetegséget eredményezhetnek. Másik lehetséges magyarázat, hogy egyre több olyan LGMD beteget találunk, ahol a betegség az allélikus variánsa másik izombetegségnek. Erre jó példa a *FKRP* mutációk hatása, ugyanis azok nagyon széles klinikai fenotípust eredményeznek a congenitális izomdystrophia 1C típusától az LGMD2I típusáig. Az eredmény, hogy az általunk vizsgált kohortban egyetlen betegnél sem találtunk *FKRP* mutációt arra utal, hogy feltehetően további új glycosyltranszferázok felismerésére kell még számítani. A hypoglycosylált α -DG deficienciák kimutatása során nem csak a költséges immunhisztokémiai vizsgálat és az idő és vegyszer igényes Western blot segíthet, hanem az előszűrőként alkalmazott lektin kötés vizsgálata is alkalmas lehet a glycosylatio zavarok kiszűrésére. Ezek a növényi lektinek az α -DG legnagyobb oligoszacharid láncának két legdistalisabb komponenséhez kapcsolódnak. Betegeinkben a WGA festődés csökkent, a PNA festődés pedig a kontrollnál intenzívebb volt. Tajima et al (Am J Pathol 2005;166:1121-1130) distalis myopathiában is talált hasonló, a kontrolloknál erősebb PNA festődést. Az α -DG fontos szerepet játszik a felszíni izomsejtmembránján integritásának megtartásában. Az α -DG mucin-szerű doménjének glycosylatioja kor és szövet specifikus, és az egyes izombetegségekben és denervációs folyamatokban is megváltozhat (Leschziner et al. J Neurochem 2000; 74:70-80). Legújabb eredmények azt mutatják, hogy lesz remény egyes glycosyltranszferázok expressziójának fokozásával a kóros α -DG funkció helyreállítására. Így arra kell törekednünk, hogy minél egyszerűbben és megbízhatóbban diagnosztizáljuk az α -dystroglycanopathiákat és kövessük a klinikai vizsgálatokban a glycosyltranszferázok hatékonyságát.

5.6.4. Hereditér neuropathiák diagnosztikus stratégiája

Az örökletes neuropathiák etiológiai diagnosztikája a molekuláris medicina gyors fejlődésének köszönhetően egyre bonyolultabb. A bevezetésben felsorolt 25 gén szűrése a klinikai gyakorlatban megvalósíthatatlan. Egyes nagy generációkat érintő, nagyon súlyos fenotípus esetén próbálunk minél több gént megvizsgálni, de a rutin diagnosztika számára a leggyakoribb genetikai eltérések feltérképezését javasoljuk. A mindennapok gyakorlatában nem kis kihívást jelent szokatlan klinikai megjelenési formák diagnosztikája.

Új MPZ mutáció következtében kialakuló változatos klinikai fenotípus

Egy széles spektrumú klinikai tünetekkel jelentkező öttagú család genetikai vizsgálata során az MPZ génben találtunk egy új mutációt (c.T143C), amely különlegessége, hogy az egyes családtagokban változó súlyosságú klinikai képet eredményezett (a subklinikus tünetektől a súlyos csecsemőkorban manifesztálódó formáig). A család 2 tagjánál nagyon korán (csecsemő- és gyermekkorban), míg az index betegnél csak 41 éves korban kezdődtek a tünetek. Shy et al. (Brain 2004; 127:371-384) azt feltételezte, hogy a klinikai tünetek súlyossága attól függ, hogy a mutációk az MPZ protein melyik doménjében vannak és milyen aminosav cserét eredményeznek. Jelen családjunkban a fehérje hydrophob karaktere megváltozott az aliphaticus leucin helyére az extracelluláris doménbe beépülő prolin miatt (Leu488Pro). A mutáció az MPZ harmadlagos struktúráját befolyásolta. Ez azonban nem magyarázhatja a családon belüli fenotípus variabilitást. Mivel az MPZ egy glycoprotein úgy véljük, hogy a posttranszlációs glycosylatio módosulása játszhat szerepet a jelenség kialakításában. Feltételezzük, hogy a mutáció típusa, intragenikus elhelyezkedése mellett egyéb putative gének is szerepet játszanak az MPZ gén expressziójában, az mRNS stabilitásában és a posttranszlációs fehérje módosításában. Feltehetően ezek együttese határozza meg a végső klinikai fenotípust. Eredményünk

alapján a széles fenotípusbeli variációval rendelkező AD öröklődésű családok MPZ mutációra való szűrése javasolt.

A n. suralis ultrastrukturális elváltozásai mitofuszin mutáció következtében kialakuló CMT2-ben

A mitofuszin (*MFN2*) egy nagy mitochondriális transzmembrán GTPáz, mely a mitochondriális külső membránt nagy N terminálisával hidalja át és a relative kicsi C-terminalis doménje nyúlik a cytosol felé. A GTPáz domén az N terminus mellett van, majd egy „coiled-coil” domén következik, két transzmembrán híd és végül egy „coiled-coil” domén a C terminalis farokban. Az általunk talált mutáció a GTPáz és az N terminalis „coiled-coil” domén között helyezkedik el. A mutációt először 2006-ban írták le perifériás neuropathia hátterében. Az eddigi megfigyelések alapján nincs korreláció a mutáció helye és a klinikai tünetek súlyossága között. Mivel a hereditár neuropathiák differenciál diagnosztikájában az utóbbi időben a molekuláris genetikai vizsgálatok a dominálóak keveset tudunk a mutáció következtében a perifériás idegekben kialakuló finomszerkezeti elváltozásokról. Az irodalomban mindössze egy közleményben olvashatunk a n. suralis ultrastrukturális eltéréseiről. Az általunk talált neuropatológiai eltérések jól korrelálnak ezekkel a megfigyelésekkel, azaz elsősorban a nagy myelinizált rostok kiesését észleltük, ezek helyét Büngner szalagok töltötték ki. A mitochondriális dinamika változása következtében egymáshoz szokatlanul közel levő mitochondriumok tűntek föl, melyek kicsik és electrodenzek voltak. Nem találtunk viszont a mitochondriumokban se paracrystallin, se globularis inclusiot. Az axonok paranodalis régiójában számos degeneratív elváltozás volt jelen. Az ultrastrukturális elváltozások emlékeztettek a mtDNS rendellenesség következtében kialakuló neuropathiákban látottakra. Mivel ezek az ultrastrukturális elváltozások nem specifikusak az *MFN2* mutációra nem javasoljuk a n. suralis biopsziát a diagnosztikus procedurába rutinszerűen beiktatni. Az *MFN2* molekuláris genetikai teszt diagnosztikus rátája pozitív családi anamnézissel rendelkező axonális CMT esetén 33%, ami arra utal, hogy jelen tudásunk szerint az *MFN2* mutáció a leggyakoribb oka a CMT2-nek. Mindezek alapján a CMT2 genetikai szűrését javasoljuk az *MFN2* génnel kezdeni.

Hereditár kórképek és autoimmun betegségek együttes előfordulása

Az örökletes betegségekben, számos esetben a genetikai hiba következtében komplex folyamatok változnak meg, melyek indirekte nemcsak a vezető tüneteket produkáló szervrendszert érintik, hanem egyes külső környezeti tényezőkkel közösen hatva az alapbetegségtől függetlennek tűnő betegséget is produkálhatnak. Vizsgálataink során immun neuropathia és hereditár sensomotoros neuropathia együttes előfordulását írtuk le. A talált genetikai eltérések és a n. suralis morfológiai vizsgálatok alapján a két betegség coexistenciája sokkal gyakoribb, mint a véletlenszerű együttes előfordulás, de vannak olyan közlések is, melyek azt vélik, hogy a hereditár neuropathiák shubokban zajló rosszabbodása hátterében feltételezhető a genetikai hibához társuló gyulladásos immun mediálta komponens jelenléte. A hereditár neuropathiákhoz társuló immun diszfunkciót többen is megfigyelték: egyes CMT családokban az aktivált T lymphocyták arányát találták magasabbnak, mások hereditár neuropathia állatmodellekben az immun deficiens genetikai háttérbe való visszakeresztezés során a myelinizáció csökkenését találták. Nagyon valószínű, hogy autoimmun mechanizmusok is szerepet játszanak a betegség progressziójában, mert a *PMP22* duplikációval rendelkező betegek kb. 70 % -ban a *PMP22* protein ellenes antitestet figyelték meg. Az izolált IgA hiány sokkal gyakoribb volt a CMT1A betegek között, mint az egészséges populációban azt jelezvén, hogy ezeknek a betegeknek a humoralis immunválasza is érintett. IgG deficiencia jelenlétéről először számolunk be *PMP22* duplikációval rendelkező családban. Az 1. betegben SLE és n. suralis vasculitis, a 2 betegben csak n. suralis vasculitis komplikálta a hereditár neuropathiát. A nőbetegekben a CD19⁺ pozitív B sejtek aránya csökkent volt. Mindkét megfigyelés szokatlan, hiszen általában emelkedett CD19⁺ B sejszám és magas IgG koncentráció várható az olyan autoimmun betegségekben, mint az SLE, bár ritkán IgA deficiencia is kíséri a szisztémás autoimmun betegségeket. A nőbetegeinkben a neuropathia sokkal kifejezettebb volt, mint a férfiban. Ez alapján felvetődött a kérdés, hogy a nemi hormonok is szerepet játszanának a neuropathia súlyosságának meghatározásában. A progesteron ugyan fokozza a *PMP22* expresszióját, de mivel a 15 és 50 év közötti *PMP22* duplikációval rendelkező betegekben nem figyelték meg különbséget a CMT1A súlyosságában az egyes nemek között, úgy véljük, hogy nem játszik szerepet a női nem a neuropathia súlyosságának

meghatározásában. Az általunk vizsgált családban a nőkben észlelt súlyosabb neuropathia feltehetően a vasculitis társulásának köszönhető.

Roma neuropathiák Magyarországon

Az AR módon öröklődő hereditær neuropathiák genetikai diagnosztikája az utóbbi években jelentősen gazdagodott. A leggyakrabban az *NDRG1*, a *CTDP1*, a *GAN1*, a *PRX*, az *SBF2*, a *GDAP1*, a *TDPI*, a *KIAA1985* gén mutációk okoznak demyelinizációs fenotípussal járó AR hereditær neuropathiát. Ezek közül az első két génben levő patogén mutációk roma alapító mutációként ismertek. Ezek nem gyakoriak, de a magyarországi romák nagy száma miatt nem lehet figyelmen kívül hagyni azokat. A betegség súlyos tüneteket okoz és a roma házassági szokások miatt nagyon sok a hordozó a hazai populációban. A roma neuropathiák diagnosztikája során érdemes a vizsgálatokat a jellegzetes roma neuropathiák alapító mutációjának szűrésével kezdeni. Vizsgálataink igazolták, hogy az egyéb európai országokhoz hasonlóan mindkét mutáció jelen van a hazai roma populációban. Betegeink klinikai adatai hasonlóak az egyéb országokban közltekkel (15. és 16. Közlemény). A legtöbb eset eddig Bulgáriában írták le. A bolgár betegek fenotípusa azonban súlyosabb volt, mint a magyar betegeké. Ezt a jelenséget a fejlettebb magyar egészségügyi ellátással magyarázzuk, ugyanis a mi betegeink többségének már kisgyermekkorában voltak korrekciós műtétei és állapotuk romlásával újabb és újabb korrekciós orthopaediai beavatkozások történtek. Így elektrofiziológiai paramétereik ugyan a bolgár betegekével hasonlóak, mégis önellátóbbak és mozgásukban kevésbé korlátozottak. A roma neuropathiás betegek szűrését a fenti alapító mutációkra nagyon fontosnak tartjuk. A roma populáció felvilágosítása a betegségről, az egymás közötti házasság veszélyeiről fontos népegészségügyi feladat. A mutáció hordozók kiszűrése és azok házassága esetén a genetikai tanácsadás, a prenatális genetikai diagnosztika segítheti a súlyos mozgáskorlátozottsággal járó kórkép megelőzését.

5.7. Az izombetegségek molekuláris terápiáinak realitásai és útvesztői

A molekuláris medicina fejlődésének köszönhetően számos új információhoz jutottunk a neurológiai kórképek diagnosztikáját, prevencióját, etiológiáját illetően. Új aspektusok nyíltak meg egyes betegségek patogenezisének értelmezésében. A molekuláris terápiák területén a fejlődés azonban lassúbb tempójú volt a vártnál. Nagyon kevés az az ideggyógyászati kórkép, ahol elegendő a tudás és tapasztalat klinikai vizsgálatok indításához. Az izomdystrophiák területén belül, mi a dystrophinopathiák kezeléséhez kívántuk optimalizálni a terápiás gén transzfert. Előzetes állatkísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a plazmid mediálta gén transzfer az immunogenitás és toxicitás hiánya, és a terápiás plazmid hosszú élettideje alapján alkalmas lehet a terápiás gén bejuttatására. Az elsőként próbált elektroporáció nem minősült optimálisnak, mivel a jó transzfekciós effektivitást eredményező paraméterek a kezelt izomban kifejezett kollaterális károsodást okoztak (18. Közlemény, 14. Absztrakt). Ez a mechanikai hatások iránt eleve túl érzékeny dystrophinopathiás izom gyógyítására nem alkalmazható. Az enhancer nélküli plazmid mediált gén transzfer humán kipróbálása igen alacsony effektivitásúnak bizonyult. Ezért mi kísérletünkben a dystrophin gént tartalmazó plazmid felvételét sonoporációval segítettük. A sonoporációt hatékonyságát microbubble molekula egyidejű injektálásával fokoztuk. A kivitelezhetőséget és biztonságosságot vizsgáló klinikai vizsgálat eredménye biztató, azaz az elvégzett vizsgálatok nem igazolóltak olyan mértékű kollaterális károsodást a kezelt izomban, amely a dystrophinopathiás izomra veszélyes lenne (23. 27. Absztrakt). Ezek a vizsgálatok a dystrophinopathiás kisfiúk Fázis IIa vizsgálatát célozták előkészíteni. Még ha a dystrophin gén replacement intramuscularis alkalmazása a betegség meggyógyítására nem is alkalmas, a betegség szempontjából leginkább érintett izmokban a dystrophin expresszió fokozása és ezzel ezen izomcsoportok erejének javítása, a kontraktúrák kialakulásának gátlása az élet minőségét lényegesen javíthatja ebben a gyors progressziójú korán tragikus kimenetelű betegségben.

6. ELÉRT TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Mitochondriális betegségek

Fenotípus-genotípus korrelációk mtDNS mutációk okozta mitochondriális betegségekben

- Elsőként írtunk le mitochondriális myopathia-neuropathia háttérében egyszeres nagy mtDNS deléciót (nt 6570 és 14150 között)
- Infantilis myopathiában szenvedő gyermek $tRNA^{Leu(UR)}$ génjében 4 szinergisztikusan ható új mutációkat írtunk le (nt 3259, 3261, 3266 és 3268 lokalizációban). Ezek közül a $tRNA^{Leu(UR)}$ gén anticodonjában az A3266G mutáció kiemelt jelentőségű, mivel a mutáció következtében a genetikai kód a $tRNA^{Ser(UCN)}$ anticodonjává változott.
- Dystonia és stroke-szerű tünetek háttérében először írtuk le az mtDNS A8332G szubsztitúció patogenitását és a társuló nem-szinoním SNP-k szinergisztikus hatását.
- Új fenotípust társítottunk az mtDNS A8344G mutációjához maternálisan öröklődő affektív megbetegedés képében egy dizygota ikerpárnál és édesanyjuknál.
- Az mtDNS A8344G mutáció okozta myoclonus epilepsiás egypetűjű ikerpárnál az életkor előrehaladtával divergáló klinikai kép alapján az epigenetika fontosságára hívtuk föl a figyelmet a mitochondriális betegségekben is.
- Az mtDNS $tRNA^{Lys}$ és határoló gének rendkívüli variabilitásának igazolásával a régió vizsgálatának rutin diagnosztikus fontosságát emeltük ki.
- Elsőként írtuk le az autosomális domináns progresszív ophthalmoplegia externa háttérében az RRM2B heterozygota mutációját.

Doppler és PET vizsgálatok mitochondriális betegekben

- Enyhe kis arteriola diszfunkciót írtunk le a mitochondriális kórképekben.
- A cerebrális glükóz metabolizmus érintettségét igazoltuk mind a központi idegrendszeri tünetekkel rendelkező, mind a csak perifériás idegrendszeri tünetekkel bíró mitochondriális betegekben.
- A mitochondriális betegek cerebrális neuronjainak FDG uptake-je az occipitalis és a temporalis régiókban csökkent leginkább.

Preimplantációs diagnosztika validálása heteroplasmikus egér modellen

- A korai embryo egyes blastomerjeinek heteroplasmia arányainak meghatározásával elsőként validáltuk a preimplantációs diagnosztika alkalmazhatóságát a pontmutációk okozta mtDNS mutációk prenatalis diagnosztikájára.

Mitochondriális genetikai epidemiológia

- Elsőként végeztünk átfogó epidemiológiai elemzéseket közép-kelet Európában feltételezeten mitochondriális betegségben szenvedő kaukázusi kohortban. Az mtDNS A3243G MELAS mutáció előfordulási gyakorisága 2.2%, az A8344G klasszikus MERRF mutáció frekvenciája 2.53%. A mért frekvenciák hasonlóak a más európai országok kaukázusi populációjában mért előfordulási gyakoriságokkal.

Hereditær neuropathiák

Új MPZ mutáció leírása magyar családban

- Új MPZ mutáció következtében kialakuló markáns fenotípusbéli különbségeket írtunk le egy magyar családban. Feltételezzük, hogy a mutáció típusa, intragenikus elhelyezkedése mellett egyéb putative gének is szerepet játszanak az MPZ gén expressziójában, az mRNS stabilitásában és a posttranszlációs fehérje módosításában és ezek együttese határozza meg a végső klinikai fenotípust.

Mitofusin mutáció következtében kialakuló strukturalis és ultrastrukturalis jellegzetességek

- Hereditær axonális neuropathiát okozó mitofusin mutáció következtében a n. suralisban látható morfológiai képet az első között jellemeztük. A nagy myelinizált rostok kiesése mellett a

Schwann sejtek adaxonális compartmentjeiben felszaporodó kis mitochondriumok nem specifikusak a mitofusin mutációk okozta neuropathiákra, így a morfológiai vizsgálat nem alkalmas a genetikai vizsgálatra való előszűrésre.

Roma neuropathiák detektálása Magyarországon

- Magyarországon elsőként írtuk le a sajátos roma típusú hereditær sensomotoros neuropathiákat (Lom és congenitalis cataracta, facialis dysmorphismus, neuropathia).

Primer és szekunder mitochondriális diszfunkció következtében kialakuló neuropathia

- Primer mitochondriális betegségekben a vasa nervorumban és a perifériás idegekben is megacloialis és pleiocloialis mitochondriumokat találtunk, amelyek arra utalnak, hogy a mitochondriális diszfunkció szerepet játszik a betegségben előforduló perifériás neuropathia kialakításában.
- A szekunder mitochondriális diszfunkcióval járó kórképekben, mint az IBM igazoltuk a perifériás neuropathia jelenlétét. A mitochondriális diszfunkció hátterében mtDNS deléciókat találtunk. A perifériás neuropathia nemcsak sporadikus IBM-ben, hanem a hereditær formában is jelen volt.
- A NOTCH3 mutáció következtében kialakuló CADASIL szindrómában is találtunk másodlagos mitochondriális diszfunkciót és perifériás neuropathiát.

Izomdystrophiák

A molekuláris genetikai diagnosztika kihívásai a dysferlin deficiencia felismerésében

- Felhívtuk a figyelmet a genetikai diagnosztika korlátaira és a nem kódoló génszakaszok patogénitkai jelentőségére a dysferlin deficienciában.

Dystrophin gén mutáció és szekunder calpain deficiencia együttes jelenléte

- A másodlagos calpain és dystrophin hiány együttes jelenlétének jótékony hatását figyeltük meg dystrophin microdeléció okozta dystrophinopathiában.

A dystrophin gén rendellenességének igazolása NDF4 okozta halláskárosodásban.

- A dystrophin intronikus splicing variációjaként kialakult DFN4 non-szindrómás süketséget a Duchenne típusú izomdystrophia allélikus variánsaként elsőként igazoltuk.

Molekuláris terápia a neurológiában

Elektroporáció alkalmazása terápiás gén bevitelére

- Dystrophinopathiás mdx egér modellen elemeztük az elektroporációt befolyásoló tényezőket és kidolgoztuk az effektív elektroporáció paramétereit. Megállapítottuk, hogy a Hyaluronidáz adása növeli az elektroporáció hatékonyságát és immunosuppresszív hatással is rendelkezik.

Sonoporáció alkalmazása a terápiás gén bejuttatása az izomsejtekbe. Fázis I vizsgálat.

- Elsőként teszteltük a sonoporáció és egyidejűleg intramuscularisan alkalmazott microbubble human izomra kifejtett hatását. A beavatkozás fájdalomtalan és biztonságosnak minősült, így az a további humán vizsgálatokban alkalmazható..

7. A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE

KÖZLEMÉNYEK:

1. Mechler F, Molnár M, Diószeghy P, Ádány .: The significance of dystrophin immunohistochemistry in the diagnosis of the muscular dystrophies. Clin Neurosci/ Ideggyógy Szle 1992, 45:295-300
2. Mechler F, Molnár M, Balázs M, Matkó J: Intracellular free calcium concentration in lymphocytes of patients with muscular dystrophies. Biochim biophys Acta (Amsterdam) 1989; 1012:227-230
3. Molnár M, Diószeghy P, Mechler F: Carnitine deficient myopathy – A case report. Clin Neurosci/Ideggy Szle 1992; 45:301-305
4. Molnar MJ, Neudecker S, Schröder JM: Increase of mitochondria in vasa nervorum of cases with mitochondrial myopathy. Kearns-Sayre syndrome, progressive external ophthalmoplegia and MELAS. Neuropathol and Applied Neurobiology 1995; 21:432-439
5. Molnar M, Zanssen S, Buse G, Schröder JM.: A large-scale deletion of mitochondrial DNA in a case with mitochondrial myopathy and neuropathy. Acta Neuropath. (Berl) 1996; 91:654-658
6. Zanssen S, Molnar M, Schröder JM, Buse G.: Multiple mitochondrial tRNA(UUR) mutations associated with infantile myopathy. Mol Cell Biochem 1997; 174: 231-236
7. Schröder JM and Molnar M.: Mitochondrial abnormalities and peripheral neuropathy in inflammatory myopathy, especially inclusion body myositis. Mol Cell Biochem 1997; 174:277-281
8. Zanssen S, Molnar M, Buse G, Schroder JM: Mitochondrial cytochrome b gene deletion in Kearns-Sayre syndrome associated with a subclinical type of peripheral neuropathy. Clinical Neuropathol 1998; 17:291-296
9. Karpati G, Pari G, Molnar MJ: Molecular therapy for genetic muscle diseases – status 1999. Clinical Genetics 1999; 55:1-8.
10. Molnár M, Karpati G: A myalgia differenciáldiagnosztikája és terápiája – status 1999 Clin Neurosci/Ideggyógy. Szle 1999; 52:294-300
11. Zanssen S, Molnar M, Buse G, Schroder JM: Novel cluster of tRNA Leu(UUR) mutations in a sporadic case of infantile myopathy restricted to muscle tissue. Neuropediatrics 2000; 31; 93-96
12. Molnar M, Valikovics A, Molnar S, Tron L, Dioszeghy P, Mechler F, Gulyas B: Cerebral blood flow and glucose metabolism in mitochondrial disorders. Neurology 2000; 55:544-548
13. Hermanns B, Molnar M, Schroder JM: Peripheral neuropathy associated with hereditary and sporadic inclusion body myositis: Confirmation by electron microscopy and morphometry. J Neurol Sci 2000; 179:92-102
14. Hidasi E, Molnar M, Dioszeghy P, Mechler F: Electroneurographic and electromyographic alterations in mitochondrial disorders. Clin Neurosci/Ideggy Szle 2001; 54:165-171
15. Kalaydjieva L, King R, Gresham D, Molnar M, et al.: Hereditary motor and sensory neuropathy Lom. Acta Myologica 2001; 20:192-201

16. Tournev I, Thomas PK, Angelicheva D, King R, Youl B, Guergueltcheva V, Ishpekova B, Bleichsmidt K, Swoboda K, Petkov R, Molnar M, et al.: Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome – Clinical, neuropathological and genetic investigation. *Acta Myologica* 2001; 20:210-219.
17. Dean NL, Battersby BJ, Ao A, Gosden RG, Tan ST, Shoubridge EA, Molnar MJ: Prospects of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:631-638
18. Molnar MJ, Gilbert R, Lu Y, Liu AB, Guo A, Larochelle N, Orlopp K, Lochmuller H, Petrof BJ, Nalbantoglu J, Karpati G. Factors influencing the efficacy and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther* 2004; 10: 447-455
19. Schröder JM, Züchner S, Dichgans M, Nagy Z, Molnar MJ.: Peripheral nerve and skeletal muscle involvement in CADASIL. *Acta Neuropathologica (Berl)* 2005; 110:587-599
20. Szabó A, Züchner S, Siska E, Mechler F, Molnar MJ: Marked phenotypic variation in a family with a new myelin protein zero mutáció. *Neuromuscular Disorders* 2005; 15:760-763
21. Molnár MJ: A neuromuscularis betegségek kezelése és rehabilitációja. *Gyermekegyógyászat*. 2005; 5:499-506
22. Molnár MJ: Az intravénás immunoglobulin alkalmazása autoimmun neuromuscularis betegségekben *Clin Neurosci/Ideggy Szle* 2006; 59:98-106
23. Molnar MJ, Bencsik P: Establishing a neurological - psychiatric biobank: banking, informatics, and ethics. *Cell Immun* 2006; 244:101-104
24. Szabó A, Siska É, Molnar MJ: Herediter motoros és sensoros neuropathia-Lom. Első magyarországi közlés. *Clin Neurosci/Ideggy. Szle* 2007; 60:51-55
25. Siska É, Neuwirth M, Gooding R, Molnár MJ: Congenitalis cataracta facialis dysmorphismus neuropathia szindróma (CCFDN). Első magyarországi közlés. *Clin Neurosci/Ideggy*. 2007; 60:257-262
26. Gal A, Siska E, Nagy Z, Karpati G, Molnar MJ: Challenges for the genetic screening in dysferlin deficiency report of an instructive case and the review of the literature *Clin Neuropathol* 2008; 27: 289-294
27. György I, Bíró A, Mechler F, Molnár MJ: Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy (HNPP) in Childhood. *Clin Neurosci/Ideggy Szle* 2008; 61:423-425
28. Molnar MJ, Perenyi J, Siska E, Nagy Z: Depressive mood disorders associated with the typical MERRF (A8344G) mutations of the mitochondrial DNA. *Journal of Neurology*. 2009; 256:264-265
29. Pal Z, Kiss E, Gal A, Csepany T, Lengyel A, Molnar MJ: Genetically determined neuropathy (CMT 1A) accompanied by immune dysfunction – a case report. *Inflamm. Research* 2009; 58: 359-364
30. Tyynismaa H, Ylikallio E, Molnar MJ, Haller R, Suomalainen A: A heterozygous mutation in *RRM2B* causes autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions *Am J Hum Genet*. 2009 85:290-5.
31. Gal A, Pentelenyi K, Remenyi V, Pal Zs, Csanyi B, Tomory B, Rasko I, Molnar MJ:

Novel heteroplasmic mutáció in the anticodon-stem of mitochondrial tRNA^{Lys} associated with dystonia and stroke-like episodes Acta Neurol Scand 2009 DOI:10.1111/j.1600-0404.2009.01297.x

32. Gal A, Komlosi K, Maasz A, Pentelenyi K, Remenyi V, Ovary C, Valikovics A, Dioszeghy P, Bereczki D, Melegh B, Molnar MJ: Molecular epidemiology analysis of the mtDNA A3243G mutation in Hungary Centr Eur J Med 2009 DOI:10.2478/s.11536-009-0118-2

IDÉZHETŐ PER-REVIEW ABSZTRAKTOK

1. Molnar M., Neudecker S. and Schröder JM.: Increase of the number and volume of mitochondria in blood vessels of sural nerves in cases of mitochondrial myopathy with or without encephalopathy. Clinical Neuropathology 1994, 5:258
2. Neudecker S, Molnár M, and Schröder JM.: Correlation between morphometric changes of mitochondria in blood vessels of skeletal muscle in mitochondrialriopathies with or without CNS-involvement. Clinical Neuropathology 1994, 5:260
3. Molnár M, Neudecker S, and Schröder JM.: Mitochondriopathies: Manifestation in muscle, peripheral nerve, and blood vessels. Idegyógy Szle 1995 48. Suppl.1:76
4. Zanssen S, Molnar M, Schröder JM., Buse G.: A novel mitochondrial tRNA anticodon point mutation associated with infantile myopathy. J Mol Med 1995; 73:B60
5. Molnar M, Valikovics A, Diószeghy P, Bereczki D, Mechler F, Csiba L: Decreased cerebrovascular reserve capacity in patients with various types of mitochondrial disorders. Neuromuscular Disorders 1997; 7:450-451
6. Molnar M, Valikovics A, Tron L, Kerényi L, Gulyás B, Mechler F, Csiba L: Changes in neuronal metabolism and cerebrovascular reserve capacity in mitochondrial disorders studied by positron emission tomography and transcranial Doppler sonography. Neurology 1998; 50: S4, A48
7. Molnar M, Hidasi E, Gulyas B, Valikovics A, Molnar S, Mechler F: Correlative multimodal functional assesment of mitochondrial disorders. A potential tool for prognosis. Muscle and Nerve 1998; Suppl.7 p. S176
8. Molnar MJ: The diagnostic possibility of the mitochondrial disorders. IdegySzle/Clin Neurosci 1999; 52:160-161
9. Molnar MJ, Shoubridge E: Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial disorders. Neuromusc Disord 1999; 9:521
10. Molnar MJ, Perenyi J, Siska E: Neuropsychiatric phenotype associated with the typical MERRF mutáció of the mitochondrial DNA J Neurol Sci 2001; 187, Suppl.1:355
11. Molnar MJ, Siska E, Kalaydijeva L: Unique peripheral neuropathies in the gipsy population in Hungary. Abstract Neuromusc Disord 2001; 11:661
12. R. Gilbert, A-B Liu, J-S Moon, MJ Molnar, J Nalbantoglu, PJ Basil, G Karpati: Very good transgene expression after electrotransfer of plasmid DNA in muscles of various mouse strains and Mol Ther 2002; 5:S367

13. Molnar MJ, Gilbert R, Nalbantoglu J, Karpati G: Very good plasmid-mediated transgene expression after electroporation in muscles of various mouse strains. *Acta Neuropathol* 2002; 104:561
14. Molnar MJ, Gilbert R, Petrof BJ, Nalbantoglu J, Karpati G: How does in vivo electrotransfer and hyaluronidase markedly enhance uptake of plasmid gene vector into skeletal muscle fibers and at the same time cause collateral damage? *J Neurol Sci* 2002; 199:S75
15. Molnar MJ, Gilbert R, Nalbantoglu J, Petrof B, Karpati G: The efficacy and longevity of plasmid based gene transfer after electroporation into muscles of various mouse strains. (Abstract) *Neuromusc Disord.* 2003; 13:665-666
16. Mechler F, Szabó A, Siska É, Züchner S, Molnar MJ: Phenotypic variation in a family with MPZ gene mutation. *Neuromusc Disord.* 2003; 13:653-654
17. Karpati G, Gibert R, Lu Y, Molnar MJ, Petrof B, Nalbantoglu J: Long term expression of transgene delivered by plasmid and electrotransfer into muscle fibers of immune deficient mice. *Neurology* 2003; S1:A 457
18. Molnar MJ, Sinnreich M, Herczegfalvi Á, Siska É, Karpati G: Combined deficiency of calpain and dystrophin mutually reduce the severity of phenotypes? *Neurology* 2004; 7 (S5):A169
19. Gilbert R, Larochelle N, Lu Y, Molnar MJ, Liu AB, Petrof BJ, Orlopp Ch, Lochmuller H, Nalbantoglu J, Karpati G: Factors influencing the transduction efficiency and duration of transgene introduced into muscles by plasmid-mediated electrotransfer. *Neurology* 2004; 7 (S5):A13-14
20. Siska É, Mechler F, Sinnreich M, Molnar MJ: Az izomdystrophia diagnosztikájának új lehetőségeiről egy dysferlinopathiás betegünk kapcsán. *Cephalalgia Hungarica* 2005; 15:104
21. Tóth I, Bori Z, Molnár MJ: Fenotípus variáció MERRF szindrómás egyetűjű ikertestvérekben. *Cephalalgia Hungarica* 2005; 15:111
22. Dodig DM, Therrien Ch, Molnar MJ, Karpati G, Sinnreich M: Altered expression of caveolin-3 in muscles of patients with dysferlin deficiency. *Neurology* 2005, 64(S1): A175
23. Molnar MJ, Gilbert R, Petrof B, Nalbantoglu J, Karpati G: Preparation for sonoporation enhanced plasmid mediated therapeutic gene transfer to skeletal muscle: a Phase I trial. *Neuromusc Disord* 2006; 16:S158
24. Szabó A, Sinnreich M, Molnar MJ, Karpati G: Alpha-dystroglycan hypoglycosylation in limb girdle muscular dystrophies. *Neurology* 2006, S2 A362
25. Gal A, Molnar MJ: The coexistence of an East-Asian mitochondrial anthropological marker and the C8270T, A8332C, and A8347C mtDNA mutácións in a Hungarian family with dystonia and juvenile stroke syndrome *European Journal of Human Genetics*, 2008; 16 S2: 266-267
26. Molnar MJ, Pentelenyi K, Remenyi V, Pal Z, Bereznai B, Gal A. The clinical importance of variability of tRNA LYS and its neighbouring mtDNA sequence. *European Journal of Human Genetics* 2009; 17 S2: 69-70
27. Molnar MJ, Gilbert R, Gal A, Karpati G. Sonoporation of human biceps muscle as preparation for plasmid-based dystrophin gene transfer. *Neurology*. 2009; 72 S3: 306-307

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutató munka a klinikus számára a postgenomika korszakában sajátos kihívást jelent. A gyógyító tevékenység sem képzelhető el team munka nélkül, de hatványozottabban érvényesül ez a tudományos tevékenységben. A disziplinakon áthatoló szemlélet hozhatja meg az eredményt.

Doktori értekezésemet mesteremnek, a neuromuscularis kutatás egyik legtiszteltebb alakjának, George Karpati emlékének ajánlom, akinek bölcsessége, tisztánlátása, embersége több mint 15 éven át formálta szemléletemet, segítette tanácsaival klinikai és tudományos tevékenységemet.

Köszönettel tartozom professzoraimnak, akik a neurológia, a neuropathológia és genetika világába bevezettek. Mechler Ferenc és Diószeghy Péter a DOTE Neurológiai Klinikáján, Michael J. Schröder az aacheni egyetem neuropathológiai intézetében, Eric Shoubridge a McGill Egyetemen. A neurogenetika iránti vonzalmat az aacheni kutatócsoport tagjaival, Stephan Züchnerrel és Stephanie Zansennel közösen alapoztuk meg, köszönöm nekik az inspirációt és a mai napig tartó lelkesítést.

Külön köszönettel tartozom Tulassay Tivadarnak, aki lehetővé tette kutatócsoportom Semmelweis egyetemi integrációját és megteremtette számunkra a gyógyító és kutató munka feltételeit. A SE és a DEOEC Neurológiai Klinika igazgatóinak Bereczki Dánielnek és Csiba Lászlónak, valamint az OPNI főigazgatójának, Nagy Zoltánnak köszönettel tartozom a szakmai támogatásért.

Az értekezésben bemutatott multidiszciplináris kutató munkában tanítványaim jelentős szerepet tölthettek be. Dinamikus, szorgalmas munkájáért köszönettel tartozom Gál Anikónak, Pál Zsuzsannának, Bereznai Benjaminnak, Pentelényi Klárának, Reményi Viktóriának, Inczedy-Farkas Gabriellának és Szabó Antalnak.

Úgyszintén szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak a tanároknak, kollegáknak, pályatársaknak és barátoknak, akik a doktori értekezés írásakor fontos tanácsokkal, észrevételekkel segítettek a munkámat.

Hálás vagyok az értekezésben bemutatott betegeknek a készséges együttműködésükért.

Köszönöm férjemnek, Németh Györgynek, a megértést, a türelmet, és a szakmai tanácsokat, melyekkel mind a kutató munka során és a doktori értekezés összeállítása közben is folyamatosan támogatott.